

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Argam Alaverdyan

Karyotypová variabilita sekáčů čeledi Nemastomatidae (Arachnida:
Opiliones)

Karyotype variability of harvestmen from Nemastomatidae family
(Arachnida: Opiliones)

Diplomová práce

Školitel: RNDr. František Šťáhlavský, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 4. 2018

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Františku Šťáhlavskému, Ph.D. za obrovskou trpělivost, odbornou radu a ochotu pomoci v nejtěžších chvílích. Dále patří můj obrovský vděk kolegům z laboratoře Mgr. Matyášovi Hiřmanovi, Mgr. Pavlu Justovi, Mgr. Janě Štundlové, kteří byli vždycky nápomocní a udrželi mi správnou morálku. Veliké díky patří i všem lidem z oddělení bezobratlých, kteří se za ta léta podíleli na sběrech žlaznatek, a také Dr. Axelu L. Schönhoferovi za determinaci žlaznatek. Poslední vděk směřuji své rodině a přítelkyni, s jejichž podporou byla tato cesta příjemnou kapitolou mého života.

Abstrakt

Diplomová práce se soustředí na cytogenetickou analýzu a porovnání karyotypové variability čeledi Nemastomatidae (Žlaznatkovití). Tato čeleď zahrnuje morfologicky uniformní sekáče drobných rozměrů s nízkou mobilitou s centrem rozšíření v Evropě. Zjištěné karyotypové rozdíly by mohly hrát důležitou roli při detekci kryptické diverzity této skupiny. Provedená karyotypová analýza žlaznatek se soustředí převážně na alpské a pyrenejské endemické druhy a zároveň na široce rozšířené taxony v rámci střední Evropy. Cílem je identifikování nejen rozdílů, které se vyskytují mezi jednotlivými rody a druhy, ale případně i mezi populacemi. K detekci konkrétních chromozómových přestaveb v evoluci karyotypu u žlaznatek byla využita i fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) pro lokalizaci počtu a pozice klastrů genu pro 18S rRNA. Z výsledků vyplývá, že čeleď Nemastomatidae má celkový rozsah počtu chromozómů $2n = 12-30$. Dále se zjistilo, že v karyotypech Nemastomatidae převládají dvouramenné chromozómy a u druhů s nižšími počty chromozómů dochází k nápadné velikostní diferenciaci chromozómů (pravděpodobně jako důsledek chromozómových fúzí). Dosavadní výsledky naznačují, že u některých morfologicky uniformních druhů může být znalost karyotypu využitelná k taxonomickým účelům.

Klíčová slova: cytogenetika, sekáči, Nemastomatidae, FISH, 18S rDNA, karyotyp

Abstract

This master's thesis is focused on cytogenetic analysis and karyotype variability of the Nemastomatidae family. This family comprises morphologically uniform harvestmen of small sizes, with low mobility, and with center of distribution in Europe. Karyotype differences could play an important role for detection of cryptic diversity in this family. The karyotype analysis is focused mainly on Alpine and Pyrenean endemic species but also on other taxons located in Central Europe. The goal was not only to identify the differences which occur between the specific genera and species, but also eventually between populations. For detection of the specific chromosomal alterations in evolution of the karyotype in Nemastomatidae the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was used, localizing the positions and amounts of gene clusters for 18S rRNA. From the results we can assume that the number of chromosomes in the family Nemastomatidae can range between $2n = 12-30$. Further it was found out that in Nemastomatidae the biarmed chromosomes are more prevalent, and that the species which have lower amounts of chromosomes contain chromosomes that noticeably differ in size (probably because of chromosomal fusions). These results indicate that with some morphologically uniform species, the knowledge of specific karyotype can be effectively used for taxonomic classification.

Key words: cytogenetics, harvestmen, Nemastomatidae, FISH, 18S rDNA, karyotype

Slovník pojmů a seznam zkratek

BSA – hovězí sérový albumin, protein, který slouží jako blokátor mnoha reakcí (blokace volných vazebních míst)

DAPI – 4', 6-diamidino-2-phenylindol; fluorescenční barvivo, které se váže na DNA

Denhardtův roztok – blokátor nespecifického nasednutí sondy (50x Denhardtův roztok: 2,5g Ficoll, 2,5g Polyvinilpyrrolidon, 2,5g BSA, 250 ml H₂O)

FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

Heteropyknóza – barvitelnost chromozómů, může být jak pozitivní (intenzivněji obarvené chromozómy) tak i negativní (slabě obarvené chromozómy)

HSCH - relativní chromozómová délka vypočtena pro haploidní sadu chromozómů

NOR – nukleolární organizátor jadérka, oblast chromozómů, ve kterém se nachází geny pro rRNA (18S, 5.8S, 28S)

PBS – pufr; 8gNaCl, 0,2g KH₂PO₄, 2,3g Na₂HPO₄.12H₂O, 1000ml H₂O, pH 7,3

PCR – polymerázová řetězová reakce (z anglického polymerase chain reaction)

rDNA – úseky DNA, které kódují geny pro ribozomální RNA

Sörensenův pufr – 4,75g Na₂HPO₄.12H₂O, 4,54g KH₂PO₄, 1000ml H₂O, pH 6,8

SSC – SSC pufr (20x SSC pufr: 175,32g 3M NaCl, 88,23g 0,3M C₆H₅O₇Na₃.2H₂O, 1000ml H₂O, pH 7)

Taq polymeráza – DNA polymeráza, která je izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* po účely metody PCR

Obsah

1. Úvod	8
• 1.1. Fylogeneze a klasifikace sekáčů	9
• 1.2. Čeleď Nemastomatidae.....	12
○ 1.2.1. Podčeleď Nemastomatinae.....	14
○ 1.2.2. Podčeleď Ortholasmatinae	15
• 1.3. Cytogenetika sekáčů	16
2. Cíle práce.....	20
3. Materiál a metodika	21
• 3.1. Sběr materiálu	21
• 3.2. Cytogenetické metody	21
○ 3.2.1. Příprava chromozómových preparátů	21
○ 3.2.2. Analýza karyotypu	22
○ 3.2.3. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s nepřímo značenou sondou	22
4. Výsledky	25
5. Diskuze.....	46
• 5.1. Karyotypová variabilita Nemastomatidae	46
• 5.2. Výskyt nukleolárních organizátorů jádérka.....	51
6. Závěr	54
7. Literatura	55
8. Přílohy.....	65

1. Úvod

Název Nemastomatidae Simon, 1872 je složen z řeckých slov *nema* (vlákno) a *stoma* (ústa) narážející na tenké pedipalpy typické pro zástupce této čeledi. Zpravidla se jedná o sekáče malých rozměrů (1,2 – 5,6 mm) vyskytující se v půdní hrabance v blízkosti vlhčích oblastí. Žlaznatky jsou typické také svým zbarvením, které je převážně bledě hnědé až do černa s častým výskytem stříbrných a zlatých skvrn na hřbetní straně (Gruber 2007). Nemastomatidae (žlaznatky) náleží do nadčeledi Troguloidae z podřádu Dyspnoi, které spadají pod řád Opiliones (sekáči) ve třídě Arachnida (pavoukovci).

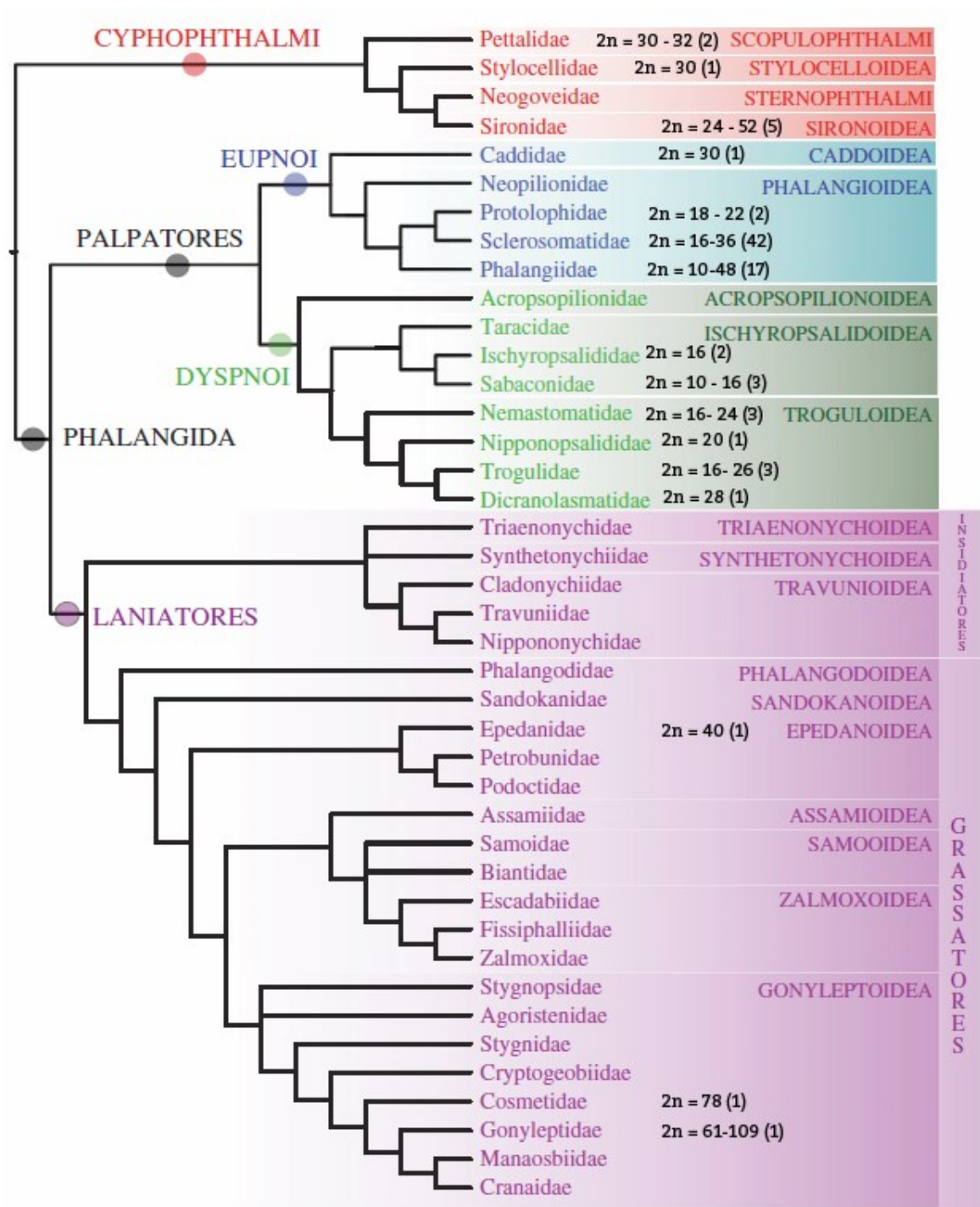
Žlaznatky jsou vázány na půdní prostředí stejně jako řada jiných skupin sekáčů z podřádu Dyspnoi. Takové druhy mají často limitované možnosti šíření a analýzy DNA ukazují, že velmi často skrývají kryptické druhy s výraznou genetickou odlišností (např. Schönhofer & Martens 2010; Schönhofer *et al.* 2013). Odhalení některých kryptických druhů je možné také na základě odlišných karyotypových charakteristik za využití cytogenetických metod (Schönhofer & Martens 2012). K tomu je nicméně potřeba rozsáhlejší znalost karyotypů umožňující porovnání a znát míru variability charakteristické pro jednotlivé druhy. V tomto směru máme v současné chvíli o sekáčích jen omezené informace. Máme sice k dispozici údaje o karyotypech 90 druhů sekáčů, čímž se řadí mezi čtvrtý nejlépe cytogeneticky prozkoumaný řád pavoukovců, nicméně pouhé 3 druhy náleží do čeledi Nemastomatidae (Tsurusaki *et al.* 2018). Známý jsou navíc pouze základní údaje o diploidním počtu chromozómů u tří druhů náležejících ke třem různým rodům (Sokolow 1929; Tsurusaki 2007). Takto fragmentární údaje nemohou přispět k rekonstrukci karyotypové evoluce a v podstatě je ani není možné využít k případným cytotaxonomickým účelům. Hlavním cílem této práce přinést podrobnější údaje o karyotypech jednotlivých druhů z čeledi Nemastomatidae a lépe pochopit karyotypovou variabilitu v rámci této čeledi.

1.1. Fylogeneze a klasifikace sekáčů

Sekáči jsou po roztočích a pavoucích třetím nejpočetnějším řádem třídy pavoukovců s celkově 6653 popsányými druhy dělicí se do 4 podřádů, přibližně 50 čeledí a přes 1500 rodů (Kury 2018). Sekáči tvoří důležitou součást mnoha suchozemských ekosystémů, především půdních, ve kterých jsou mrchožrouti nebo predátoři malých členovců a ostatních bezobratlých. Předpokládá se, že sekáči patří k jedné z nejstarších suchozemských skupin živočichů, hlavně díky prvnímu fosilnímu záznamu, který je datován přibližně před 405 miliony lety z devonu (Dunlop *et al.* 2003). Hlavní diverzifikace skupiny nastala v období karbonu přibližně před 310 miliony lety. Z karbonu také pochází nově objevená fosilie, která naznačuje existenci nového vymřelého podřádu (Dunlop *et al.* 2003). S objevením nové fosilie došlo ke změně uspořádání a postavení některých čeledí převážně z podřádu Laniatores (Sharma & Giribet 2011; Pinto-da-Rocha *et al.* 2014).

V současné době je široce akceptována prvotní systematická klasifikace Opiliones prezentovaná v monografii od Hansen & Sorensen (1904), ve které jsou Opiliones rozděleny na čtyři podřády Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi a Laniatores. Toto uspořádání se pokusila změnit analýza fylogeneze sekáčů opírající se o studium genitálií (Martens 1980). Ovšem tato snaha o změnu tradiční klasifikace sekáčů byla vyvrácena kladistickými technikami vycházející jak z širšího spektra morfologických dat tak později také molekulárně fylogenetických analýz (Pinto-da-Rocha *et al.* 2007). Podobných pokusů o testování vnitřních vztahů sekáčů bylo více (např. Hedin *et al.* 2012) avšak názory na vztahy jednotlivých podřádů jsou v současnosti ustáleny (Obr. 1) (Fernández *et al.* 2017).

Cyphophthalmi představují sesterskou skupinu linii Phalangida, do které spadají Palpatores (Eupnoi a Dyspnoi) a Laniatores (Obr. 1). Cyphophthalmi, které obsahují 208 druhů (Kury 2018), jsou děleny do čtyř infrařádů Scopulophthalmi, Sternophthalmi a Boreophthalmi obsahující 6 čeledí, které mají specifické biogeografické rozšíření (Giribet *et al.* 2012). Zatímco monofyletické postavení podřádu Cyphophthalmi uvnitř Opiliones bylo opakovaně potvrzeno (Giribet 2000; Giribet *et al.* 2012), tak názory na vztahy uvnitř sesterské skupiny Phalangida byly předmětem diskuzí (Shultz 1998; Martens 1986; Giribet *et al.* 2002).



Obrázek 1: Fylogenetické vztahy podřádů Opiliones. Převzato z Fernández *et al.* (2017) doplněno o známé diploidní počty chromozómů (Tsurusaki *et al.* 2018), v závorkách jsou počty karyotypovaných druhů.

Laniatores jsou druhově nejbohatší podřád sekáčů s celkem 4248 popsányými druhy (Kury 2018). Vztahy jednotlivých čeledí uvnitř Laniatores prošli velkou revizí po roce 2007, kdy vyšlo několik rozsáhlých studií (např. Giribet *et al.* 2010; Sharma & Giribet 2011), které modifikovaly chápání Laniatores (Giribet & Sharma 2015). Ty jsou v současnosti děleny do dvou infrařádů (Insidiatores a Grassatores) obsahující dohromady 10 nadčeledí (Obr. 1).

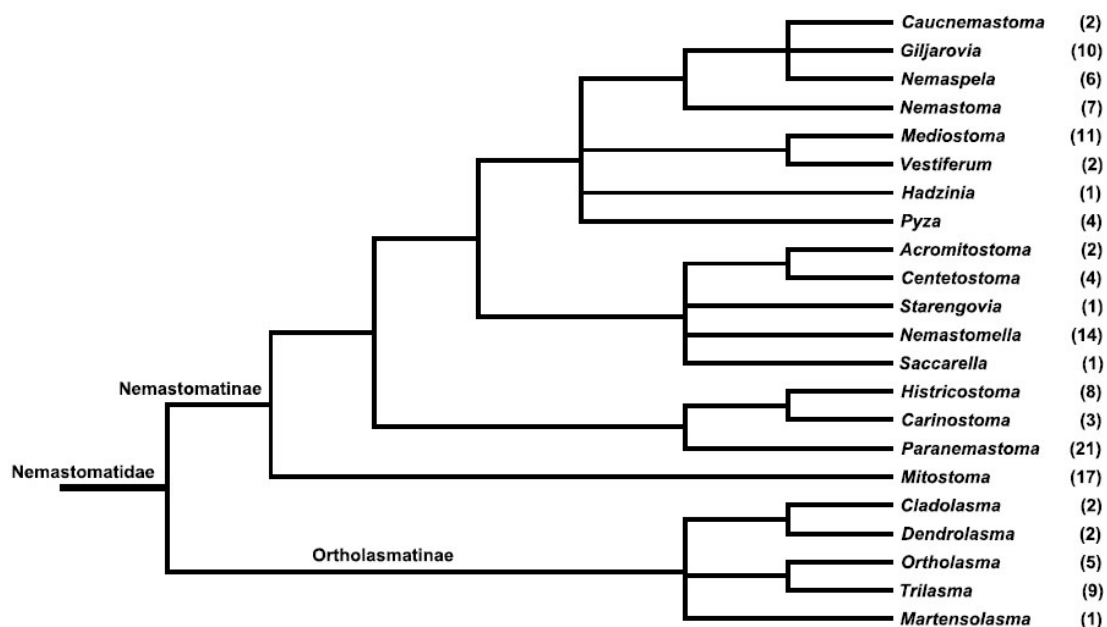
Eupnoi jsou s celkovými 1810 popsányými druhy druhým nejpočetnějším podřádem sekáčů (Kury 2018). Dělí se na dvě nadčeledi Caddoidea a Phalangioidea (Obr. 1). Ještě donedávna byla zde řazena čeleď Acropsopilionidae, která je nicméně na základě molekulárně fylogenetických analýz v současné chvíli považována za sesterskou čeleď k ostatním Dyspnoi (Groh & Giribet 2015). Fylogenetické vztahy uvnitř nadčeledi Phalangioidea zůstávají doposud nejméně pochopenou stránkou systematiky sekáčů (Giribet & Sharma 2015).

K podřádu Dyspnoi připadá celkem 387 druhů rozdělených do tří nadčeledí Acropsopilionoidea, Ischyropsalidoidea a Troguloidea (Obr. 1) (Kury 2018).

1.2. Čeleď Nemastomatidae

Žlaznatky představují největší a nejdiverzifikovanější monofyletickou skupinu v nadčeledi Troguloidea, do současné doby bylo popsáno 131 druhů ve dvou podčeledích: Ortholasmatinae a Nemastomatinae (Kury 2018). Celkem 114 recentních druhů ze 17 rodů patří do podčeledi Nemastomatinae (Obr. 2) s palearktickým rozšířením sahajícím přes celou Evropu, Kavkaz, Ural, sever Íránu až po pohoří Ťan-šan (Gruber 2007). U podčeledi Ortholasmatinae s rozšířením v Nearktické a Indomalajské oblasti je popsáno 19 druhů z 5 rodů (Schönhofer 2013).

Čeleď Nemastomatidae byla poprvé ustanovena v publikaci (Simon 1872) a zahrnovala pouze dva rody *Nemastoma* C. L. Koch, 1839 a *Ischyropsalis* C. L. Koch, 1839. Od té doby prošla čeleď mnoha revizemi (Kratochvíl 1958; Šilhavý 1966; Gruber & Martens 1968; Shear & Gruber 1983) a doposud se postavení jednotlivých rodů v čeledi neustálilo.



Obrázek 2: Kladogram Nemastomatidae – výsledek sumarizace několika studií. V závorkách je počet druhů v daném rodu. Převzato z Schönhofer (2013).

Jedním z hlavních faktorů pro pochopení evoluce sekáčů a systematiky uvnitř skupiny je především různorodá morfologie samčích genitálií. Pro žlaznatky je morfologie samčích genitálií totiž hlavním poznávacím znakem (viz přílohy Obr. 24) (Schönhofer & Martens 2012). U této čeledi sekáčů se nezávisle vyvinuly různé laterální stabilizační struktury na hlavním kmeni penisu. Tyto výčnělky slouží k zakotvení dvou svalových

šlach a považují se za obecné znaky při taxonomické klasifikaci. Podobné morfologické zvláštnosti se dají nalézt napříč celou čeledí a jednoduše slouží k determinaci rodů a někdy i druhů (Schönhofer & Martens 2012). Dalším slibným poznávacím znakem Nemastomatidae je komplex kyjovitě tvarovaných chloupků na makadlech, jejichž funkce je pořád neznámá (Wachmann 1970). Tento znak se dá pozorovat i u juvenilních stádií ostatních Trogulidae, avšak u žlaznatek zůstávají přítomné během celého života (Shear 2010).

V minulosti byly provedeny také pokusy o klasifikaci žlaznatek na základě různých vnějších morfologických znaků (Roewer 1951; Kratochvíl 1958), ale tyto snahy se ukázaly být nepřiliš specifické pro taxonomické využití (Schönhofer & Martens 2012). Výjimkou je podčeď Ortholasmatinae, která je unikátní externími ornamenty na dorsální části těla (oproti podčeďi Nemastomatinae), díky níž je jednoduše rozpoznatelná, a proto je i determinace druhů na základě morfologie možná. Nicméně uvnitř nadčeďi Troguloidea panuje značná morfologická uniformita (Schönhofer & Martens 2010), která zapříčiňuje nespolehlivou determinaci druhů, a proto je vhodné využití jiných například molekulárně-fylogenetických nebo cytogenetických metod.

1.2.1. Podčeleď Nemastomatinae

Jak již bylo zmíněno podčeleď Nemastomatinae je výhradně palearktická skupina s centrem výskytu v západní, centrální a jihovýchodní Evropě (Schönhofer 2013). Areál výskytu ovšem sahá mnohem dál na východ, objeven byl i druh z čínské provincie Yunnan rozšiřující areál výskytu této podčeledi o 3000 km jihovýchodně (Martens 2016).

Významným faktorem pro systematiku Nemastomatinae je morfologie penisu (viz přílohy Obr. 24) (Schönhofer & Martens 2012; Martens 2017). Díky různorodé stavbě penisu je determinace do rodů velice spolehlivá a tento způsob se nadále jeví přínosným i při popisu nových druhů (Martens 2016; 2017). Dalším rozpoznávacím znakem je výrůstek na chelicerách a struktura sekreční žlázy v tomto výrůstku. Tato výrazná vlastnost je přítomna u některých rodů a mohla se vyvinout několikrát nezávisle na sobě (Martens 2017).

V rozsáhlejší molekulárně fylogenetické studii zabývající se vnitřními vztahy v nadčeledi Troguloidea bylo analyzováno také 8 rodů žlaznatek reprezentující hlavní evropské linie z podčeledi Nemastomatinae (Schönhofer & Martens 2010). Z této analýzy je patrné, že bazálním rodem Nemastomatinae je *Mitostoma* Roewer, 1951, která je sesterská všem ostatním rodům (Obr. 2). *Mitostoma* se liší od ostatních extrémně komplikovanou morfologií penisu, která je nezaměnitelná s jinými rody. Poté se Nemastomatinae dělí do dvou hlavních skupin. První hlavní skupina zahrnuje rody *Carinostoma* Kratochvíl, 1958, *Histicostoma* Kratochvíl, 1958 a *Paranemastoma* Redikortsev, 1936, které mají společný znak v podobě zatočeného konce penisu. Druhou skupinou jsou zbylé rody, které mají různě diverzifikované penisy (viz přílohy Obr. 24) (Schönhofer & Martens 2012). Bohužel ale v současnosti neexistují žádné další podrobnější analýzy zahrnující větší množství druhů a populací žlaznatek, které by vedly k hlubšímu poznání evoluce této skupiny.

1.2.2. Podčeleď Ortholasmatinae

Tato podčeleď byla poprvé podrobněji popsána v publikaci Shear & Gruber (1983), která rozdělila podčeleď podle rodů ze západní Ameriky *Ortholasma* Banks, 1894 a *Dendrolasma* Banks, 1894. Od té doby přibýly pouze dvě publikace (Schwendinger & Gruber 1992; Shear 2006), které přispěly popisem nových druhů na celkový počet pěti rodů: *Martensolasma* Shear, 2006, *Cladolasma* Suzuki, 1963, *Dendrolasma* Banks, 1894, *Trilasma* Goodnight & Goodnight, 1942 a *Ortholasma* Banks, 1894 (Shear 2010). Shear (2010) předpokládá, že se nejedná o poslední přídátek nových druhů, a očekává objev nových druhů ve Střední Americe a Asii. Jeho předpoklady jsou potvrzeny v roce 2013, kdy dochází k popisu nového druhu *Cladolasma damingshan* Zhang & Zhang, 2013 z Číny. Tento druh byl zároveň první popsanou žlaznatkou v Číně (Zhang & Zhang 2013).

Ortholasmatinae jsou nejjihněji se vyskytující skupinou podřádu Dyspnoi, která se jinak nachází převážně na severní polokouli. Některé druhy těchto sekáčů jsou asociovány s boreálními regiony nebo relativně vysokými nadmořskými výškami. Podobně to platí u Ortholasmatianae, ty jsou ovšem tolerantnější na sušší oblasti za předpokladu nižších teplot (Shear 2010). Ortholasmatinae mají původ výskytu pravděpodobně ve vrchovinách v centrálním Mexiku, odkud se dále rozšířili do severozápadní části severní Ameriky a později do východní Asie. (Shear 2010).

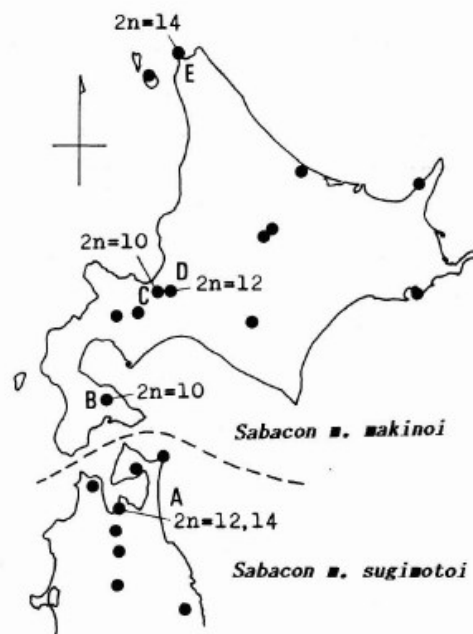
Ortholasmatinae mají na první pohled vidět ornamentovanou dorzální část těla. Tento charakteristický rys usnadňuje determinaci této podčeledi a výrazně ji odlišuje od podčeledi Nemastomatinae. Navíc se zdá, že externí charakteristiky jako např. ornamentice, mohou být propojeny s geografickou distribucí rodu (Shear 2010). Podobně jako u Nemastomatinae je hlavním taxonomickým znakem morfologická stavba penisu.

1.3. Cytogenetika sekáčů

Přestože jsou sekáči třetím nejpočetnějším řádem pavoukovců, tak v současnosti jsou k dispozici údaje o karyotypech jen u 90 druhů (Tsurusaki *et al.* 2018). Většinou se navíc jedná pouze o zdokumentovaný počet chromozómů. Krom toho převážná část znalosti cytogenetických charakteristik sekáčů pochází z podřádu Eupnoi, konkrétně z čeledi Sclerosomatidae. V rámci ní byly popsány karyotypy 42 druhů z 15 rodů. Karyotypy ostatních čeledí sekáčů jsou popsány, leckdy pouze na základě jediného druhu a neposkytují dostatečnou informaci o možné variabilitě uvnitř čeledi. Neúplnost cytogenetických údajů v rámci Opiliones mimo jiné značně omezuje možnosti pochopení evolučních mechanismů karyotypové diferenciace uvnitř řádu.

Ačkoli jsou údaje o karyotypech sekáčů fragmentární, tak je patrné že sekáči mají obvykle chromozómy s dobře patrnou centromerou s převažujícím výskytem metacentrických a submetacentrických chromozómů oproti telocentrickým a akrocentrickým chromozómům (Tsurusaki 2007). Dále také celkově tento řád vykazuje velkou variabilitu v počtu chromozómů $2n = 10-109$ (Obr. 1) (Tsurusaki *et al.* 2018). Takto vysoká variabilita není výjimkou ve třídě pavoukovců, nejvariabilnější skupinou pro tuto třídu jsou štíři s $2n = 5-174$ (Schneider *et al.* 2018). Ostatní skupiny mají variabilitu menší, pavouci $2n = 7-128$ (Araujo *et al.* 2018) štírci $2n = 7-143$ (Šťáhlavský 2018). Variabilita v počtu chromozómů u sekáčů je výrazná, hlavně u podřádu Laniatores $2n = 40-109$ (Tsurusaki *et al.* 2018). Počty chromozómů u zbylých podřádů jsou menší Cyphophthalmi $2n = 24-52$ (Svojanovská *et al.* 2016), Dyspnoi $2n = 10-28$ a Eupnoi $2n = 10-36$ (Tsurusaki *et al.* 2018). Variabilita počtu chromozómů je výrazná v některých případech i v rámci jednotlivých čeledí. Například u čeledi Gonyleptidae s neobvykle vysokým počtem chromozómů u sekáčů $2n = 61-109$ nebo u Sclerosomatidae $2n = 10-48$ (Obr. 1). Patrné jsou i mezidruhové rozdíly uvnitř některých rodů. Rod *Siro* Latreille, 1796 (Cyphophthalmi: Sironidae) má variabilitu $2n = 30-52$ nebo rod *Oligolophus* C. L. Koch, 1871 (Eupnoi: Phalangiidae) $2n = 16-30$ (Tsurusaki *et al.* 2018).

Mimo zřetelnou variabilitu počtu chromozómů mezi jednotlivými druhy byla u některých druhů sekáčů zjištěna také vnitrodruhová variabilita. Například u druhu *Sabacon makinoi* Suzuki, 1949 (Dyspnoi: Sabaconidae) ($2n = 10, 12, 14$) byla vnitrodruhová variabilita zapříčiněna geografickými bariérami, kvůli nimž vznikly izolované populace, které se následně karyotypově rozrůznily (Obr. 3) (Tsurusaki 1989). Dalším faktorem, který u sekáčů způsobuje vnitrodruhovou variabilitu, je přítomnost B chromozómů. Ty byly v rámci tohoto řádu bezpečně zjištěny u druhu *Psathyropus tenuipes* L. Koch 1878 (Eupnoi: Sclerosomatidae). B chromozómy byly u tohoto druhu registrovány u jedinců napříč celým areálem výskytu a mohou se různit v počtu, ve kterém se vyskytují. Průměrný počet B chromozómů v karyotypu *Psathyropus tenuipes* je 4, avšak jsou zaznamenáni i jedinci s celkem 19 B chromozómy (Gorlov & Tsurusaki 2000; Tsurusaki 2007). Další možnou příčinou mezidruhové variability u sekáčů může být i předpokládaná polyploidizace, která u rodu *Leiobunum* C. L. Koch, 1839, konkrétně u dvou druhů s partenogenetickým rozmnožováním *L. manubriatum* Karsch, 1881 a *L. globosum* Suzuki, 1953 zapříčinila výskyt jedinců s tetraploidním počtem chromozómů $4n = 48$ (Tsurusaki 2007).

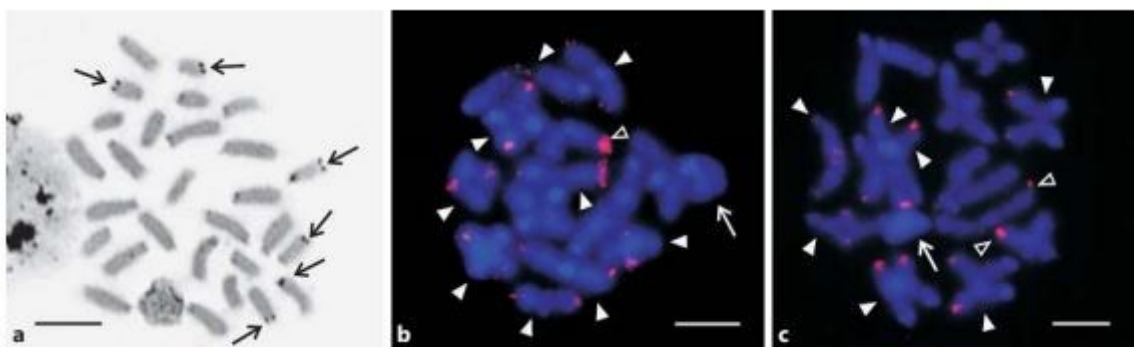


Obrázek 3: Distribuce a diploidní počet chromozómů u *Sabacon makinoi* v Hokkaido a severní části Honshu. A – Asamushi; B – Ônuma; C – Maruyana; D – Nopporo; E – Wakkanai Převzato z Tsurusaki (1989).

Další důležitou charakteristikou karyotypu může být výskyt pohlavních chromozómů. Pohlavní chromozómy byly v rámci sekáčů zatím zaznamenány u tří čeledí Phalangiidae a Sclerosomatidae z Eupnoi a Sabaconidae z Dyspnoi. Z toho se usuzuje, že vznik a diferenciace pohlavních chromozómů proběhly u těchto dvou podřádů sekáčů nezávisle na sobě (Tsurusaki 2007). Pro čeleď Phalangidae byla zjištěna přítomnost pohlavního systému ZW u druhu *Mitopus morio* Fabricius, 1799 (Tsurusaki & Cokendolpher 1990). Přestože výskyt pohlavního systému ZW nebyl zaznamenán u

žádného dalšího druhu, podle Tsurusakiho (2007) se dá očekávat objevení systému u dalších zástupců v čeledi Phalangidae. Tento systém pohlavního určení je prvním výskytem v rámci celé třídy pavoukovců (Tsurusaki 2007). Druhý pohlavní systém XY je registrován u 13 druhů z čeledi Sclerosomatidae a u *Sabacon makinoi* v čeledi Sabaconidae (Tsurusaki 1989). Pohlavní chromozómy jsou v těchto případech již zřetelně morfologicky diferenciované s výraznými velikostními rozdíly, kdy X bývá vždycky větší než Y (Tsurusaki & Cokendolpher 1990; Tsurusaki 2007). Je nicméně třeba zmínit, že přítomnost diferenciovaných pohlavních chromozómů, zejména u špatně zdokumentovaného systému ZW, byla nedávno zpochybněna domněnkou, že předchozí záznamy velikostně diferenciovaných chromozómů ve skutečnosti mohou představovat autozómy s velikostně variabilními rDNA klastry zjištěné u řady druhů čeledi Phalangidae v Jižní Africe (Šťáhlavský *et al.* 2018).

Kromě pohlavních chromozómů může být pro karyotyp charakteristická i pozice NORů na různých částech chromozómů. Tyto oblasti, ve kterých se vyskytují geny pro rRNA (18S, 5.8S, 28S) mohou pomoci k odhalení karyotypových odlišností mezi skupinami se stejným počtem chromozómů. Nejčastější způsob, který byl zatím ve většině, a to i v recentních, pracích použit k odhalení pozicí NORů u pavoukovců, je tzv. metoda stříbření. Pomocí této metody došlo k lokalizaci NORů u pavouků (např. Král *et al.* 2011; Dolejš *et al.* 2011; Král *et al.* 2013; Araujo *et al.* 2015), štírů (Schneider *et al.* 2009; Mattos *et al.* 2013), krabovců (Paula-Neto *et al.* 2013) a i štírenek (Král *et al.* 2008). Pomocí této metody byly lokalizovány NORy pouze u tří druhů sekáčů. Konkrétně jeden nepárový NOR byl identifikován u *Psathyropus tenuipes* L. Koch, 1878 (Eupnoi: Sclerosomatidae) (Gorlov & Tsurusaki 2000) a u *Dyscocyrtus pectinifemur* Mello-Leitao, 1937 (Laniatores: Gonyleptidae) (Schneider *et al.* 2008). Jeden pár NORů byl dále lokalizován u druhu *Goniosoma spelaeum* Mello-Leitao, 1932 (Laniatores: Gonyleptidae) (Oliveira *et al.* 2006). Nicméně se ukázalo, že metoda stříbření zobrazuje NORy, které jsou aktivní pouze v předcházející interfázi (Miller *et al.* 1976), čímž může dojít ke zkreslení reálného počtu NORů, který může být v karyotypu značně vyšší (Obr. 4) (Forman *et al.* 2013). Z toho důvodů se v recentních pracích zabývajících se cytogenetikou pavoukovců používá metoda fluorescenční *in situ* hybridizace se specifickou sondou pro rDNA klastr (např. Svojanovská *et al.* 2016; Almeida *et al.* 2017; Šťáhlavský *et al.* 2018).



Obrázek 4: Příklad rozdílu v počtu zobrazených NORů (šipky) za použití stříbrnění (a) a fluorescenční *in situ* hybridizace (b, c) u *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae); a – spermatogenní metafáze, černé šipky ukazují na terminální NORy; b – raná metafáze I; c – diplotene; bílé hlavičky šipek ukazují na bivalenty s NORy, černá hlavička šipky ukazuje na NOR heterozygotního bivalentu, šipka ukazuje na pohlavní chromozómy. Měřítka 5 μ m. Převzato z Forman *et al.* (2013).

Jak bylo popsáno výše, současná znalost o cytogenetických charakteristikách sekáčů je roztroušená a pro některé čeledi existují pouze jednotlivé záznamy. Pro čeleď Nemastomatidae, na kterou se tato diplomová práce zaměřuje, existují záznamy pouze o diploidním počtu u třech druhů z podčeledi Nemastomatinae. První zmínka o diploidním počtu chromozómů ($2n = 16$) u žlaznatek se týká druhu *Nemastoma lugubre* Müller, 1776 z podčeledi Nemastomatinae (Sokolow, 1929). Práce přinášející tyto informace (Sokolow, 1929) se nicméně soustředí na popis spermatogeneze za využití klasických histologických technik, a tudíž mimo uvedený počet chromozómů neobsahuje žádné další detaily o karyotypu tohoto druhu. Bohužel i novější informace o počtu chromozómů dvou druhů *Mitostoma chrysomelas* Hermann, 1804 ($2n = 24$) a *Nemastoma dentigerum* Canestrini, 1873 ($2n = 16$) (Tsurusaki 2007) nezahrnují žádné jiné cytogenetické charakteristiky. Tyto záznamy nejsou dostatečné pro pochopení celkového pohledu na karyotypovou variabilitu a evoluci čeledi Nemastomatidae. Navíc detailnější informace o karyotypu, například morfologie chromozómů nebo přítomnost pohlavních chromozómů, pomůžou lépe charakterizovat jednotlivé druhy. Tato charakterizace může následně mít taxonomické využití v rámci morfologicky uniformního podřádu Dyspnoi.

2. Cíle práce

Popis a porovnání karyotypů jednotlivých druhů z čeledi Nemastomadiae za využití klasických cytogenetických metod.

Zjistit počet a lokalizaci organizátoru jadérka (NOR) u jednotlivých druhů za využití metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Zmapování meiotického cyklu u druhů a identifikace případných rozdílů v párování chromozómů a jejich spiralizaci.

Zjistit hlavní trendy v evoluci karyotypů žlázatek na základě pozorovaných cytogenetických charakteristik.

3. Materiál a metodika

3.1. Sběr materiálu

Dospělí jedinci obou pohlaví byli individuálně sbíráni v letech 2012- 2017 na lokalitách z následujících států: Andora, Česká republika, Francie, Itálie, Německo, Rakousko, Slovinsko, Španělsko a Švýcarsko (detailně viz Tab. 2 z příloh). Sběr probíhal proséváním půdní hrabanky, která byla nabrána převážně z trvale vlhkých lesních oblastí (poblíž nevysychajících vodních zdrojů). Následně byli nasbíraní jedinci převezeni do laboratoře na přípravu chromozómových preparátů.

3.2. Cytogenetické metody

3.2.1. Příprava chromozómových preparátů

Chromozómové preparáty byly vyrobeny pomocí techniky „plate spreading“ (Traut 1976), která se úspěšně využívá u různých skupin pavoukovců, a to včetně sekáčů drobných rozměrů (např. Šťáhlavský *et al.* 2012). Pomocí této metody dochází k menším ztrátám materiálu, což je u malých živočichů klíčový faktor. Vybraným jedincům na přípravu chromozómových preparátů byly po usmrcení vypreparovány gonády a ihned umístěny do hypotonického roztoku 0.075M KCl po dobu 20. minut. Během této fáze dochází v buňkách k zvětšování objemu pomocí absorbování vody, což má za následek rozestupování chromozómů v dělicích se buňkách, a tedy snadnější pozorování jednotlivých chromozómů. Následně byly gonády přesunuty do směsi metanolu a kyseliny octové (3:1) po dobu 20. minut, kde probíhala fixace. Následně byla gonáda rozpuštěna 60% kyselině octové na podložním sklíčku. V případě většího rozměru gonád se použily wolframové drátky na rozkouskování a urychlení rozpuštění. Posledním krokem bylo přesunutí sklíčka na předem vyhřátou (40°C) histologickou ploténku a pomalé rozprostírání suspenze po povrchu sklíčka až do úplného vypaření. Připravené chromozómové preparáty byly v následujícím dnu obarveny po dobu 15 minut roztokem 5% Giemsky v Sörensenově pufru. Zbytek tkáně z jedinců byl uložen do 96% etanolu a byly následně poslány Dr. Axelu L. Schönhoferovi ze Zoologického ústavu v Mainzu v Německu na druhovou determinaci.

3.2.2. Analýza karyotypu

Pozorování sklíček připravených chromozómových preparátů probíhalo na mikroskopu Olympus Provis AX 70 nebo Olympus IX81. Pozorované chromozómy byly dokumentovány pomocí kamery Olympus DP 72 nebo ORCA-AG (Hamamatsu). Následně byly vybrány sady chromozómů, které byly vhodné pro analýzu karyotypu. Na měření chromozómových charakteristik byly použity metafáze II nebo mitotické metafáze s dobře viditelnými pozicemi centromer. Základní informace o karyotypu (diploidní počet, velikost a morfologie) byly měřeny v programu ImageJ 1.8 (<https://imagej.nih.gov/ij/>) pomocí doplňku LEVAN na determinaci morfologie chromozómů (Sakamoto & Zacaro 2009). Vždy se jednalo o získání údajů o délce krátkého raménka (p), dlouhého raménka (q), relativní délky a centromerického indexu pro každý chromozómový pár. Morfologie chromozómů byla klasifikována podle Levan *et al.* (1964) a relativní chromozómová délka vypočtena pro haploidní sadu chromozómů (HSCH) (viz přílohy Tab. 3).

3.2.3. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s nepřímo značenou sondou

Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace se dají lokalizovat specifické sekvence DNA na chromozómech pomocí značených sond. V této práci jsem využil v naší laboratoři používanou metodu FISH s nepřímo značenou sondou k detekci genu pro 18S rRNA, která probíhá navázáním specifické biotilynované nukleotidové sekvence na komplementární úsek DNA a její následná detekce pomocí protilátky (streptavidin) s návazným fluorochromem (Cy3). Tato metoda byla použita za účelem detekce počtu a distribuce NORů u analyzovaných druhů.

Sonda pro 18S rDNA byla připravena z druhu *Euscorpius sicanus* (Koch, 1837). K izolaci celogenomové DNA byl využit DNA Minikit – Tissue (Geneaid). Fragment 18S rDNA byl získán pomocí PCR ve směsi, která obsahovala následující komponenty: primery (5'-CGAGCGCTTTTATTAGACCA-3' a 5'-GGTTCACCTACGGAAACCTT-3'), Ex Taq polymeráza, dNTP's, templát (50ng), voda a pufr. Proces PCR začal počáteční denaturací za teploty 95°C po dobu 3 minut, následovala série 30 cyklů PCR (denaturace: 94° C, 30 sek., nasedání primerů: 55°C, 30 sek. a prodlužování: 72°C, 2 min.) následně přišlo konečné prodlužování za teploty 72°C po dobu 3 minut a finální chlazení na 12°C. Následně byl PCR produkt podroben elektroforetické separaci v 1% agarózovém gelu, dále se vyřízl odpovídající proužek, který

byl přečištěn pomocí GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma Aldrich). Sonda byla označena „nick“ translací biotin-14-dUTP (Roche) Nick Translation Kit (Abbott Molecular).

Příprava hybridizační směsi

Příprava hybridizační směsi (1μl sondy/ 2,5μl Salmon sperm/sklo) začala přidáním (0,35μl Na-acetátu/9,75μl 96% EtOH/sklo), čímž došlo k vysrážení DNA. Poté byla hybridizační směs zmrazena (-20°C) po dobu 80 minut. Po vyjmutí z mrazicího boxu byla směs vložena do vychlazené centrifugy (7°C) a důkladně se centrifugovala pro odseparování supernatantu. Po důkladném odstranění supernatantu byla směs vysušena v termomixu (37°C). K rozpuštění DNA došlo při teplotě 37°C ve 100% deionizovaném formamidu po dobu 30 minut. Následně došlo k přidání dextran sulfátu a celá směs byla po dobu 5 minut vystavená vysoké teplotě (90°C) ve vodní lázni, a poté prudce zchlazena na ledu.

Příprava skel

Vlastní FISH probíhala s drobnými úpravami dle protokolu Sahara *et al.* (1999). Prvním krokem po vyjmutí preparátu z mrazicího boxu (-20°C) bylo odvodnění pomocí vzestupné ethanolové řady (70%, 80%, 96%). Dále byly preparáty po aplikaci RNázy A v 2xSSC pufru inkubovány 60 minut v hybridizačních komůrkách (37°C). Chromozómové preparáty byly po působení RNázy A promyty v 2xSSC 2x5minut a 30 minut inkubovány v 5x Denhardtově roztoku. Posléze byla skla denaturována při 68°C v 70% deionizovaném formamidu v 2xSSC po dobu 3,5 minuty. Hned poté se následovalo jejich prudké zchlazení a odvodnění ve vzestupné ethanolové řadě (70% (-20°C), 80% a 96%). Na závěr byla aplikována hybridizační směs na suchá skla a přiložené krycí sklíčko bylo olemováno rubber cementem (FixoGum). Chromozómové preparáty byly ponechány do druhého dne v hybridizačních komůrkách při teplotě 37°C.

Během druhého dne byly jednotlivé kroky prováděny za šera, aby nedošlo k zbytečnému vysvícení fluorescenčně značených úseků chromozómů. Prvním krokem bylo aplikování Cy-3 konjugovaného streptavidinu (Jackson ImmunoResearch) po dobu 30minut, následně byl detekovaný signál zesílen biotinylovým antistreptavidinem (Vector Labs. Inc: 20 minut za teploty 37°C) a Cy-3 konjugovným streptavidinem (po dobu 20 minut za teploty 37°C). Každé fázi předcházelo zablokování reakce 2,5% BSA (po dobu

20 minut). Po působení avidinu byly preparáty vždy promyty v 4xSSC/0,1% Tween 3x3 minuty.

Na závěr byly chromozómové preparáty barveny předem připravenou směsí DAPI (Fluoroshield TM with DAPI) (Sigma). Po mírném schnutí byl preparát zakryt krycím sklíčkem, které bylo ještě ohraničeno lakem na nehty. Po zaschnutí byly preparáty připraveny na prohlížení za pomoci mikroskopu Olympus IX81 vybaveného ORCA-AG monochromatickou CCD kamerou (Hamamatsu). Dokumentace probíhala pomocí programu Cell[^]R (Olympus Soft Imaging Solutions).

4. Výsledky

V rámci této diplomové práce byly analyzovány karyotypy 12 druhů a 4 poddruhů ze 7 rodů (Tab. 1). Výsledky jsou sumarizací zjištěných cytogenetických charakteristik karyotypů celkově 76 jedinců ze 43 lokalit (viz přílohy Tab. 2).

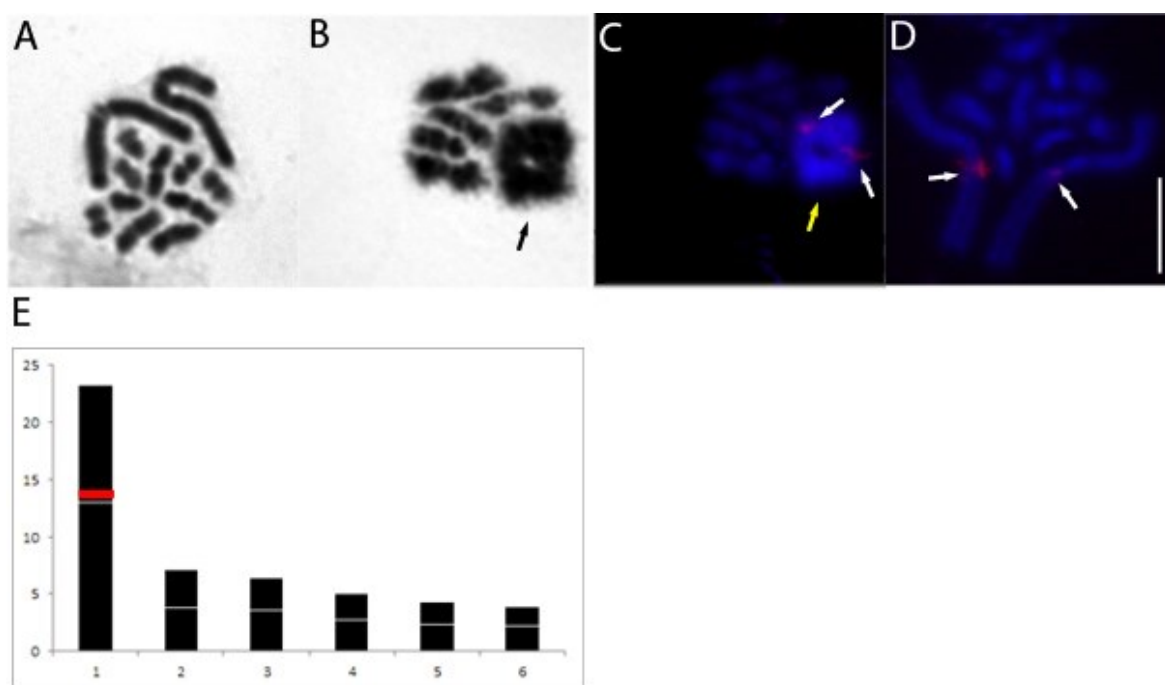
Celkem se podařilo zjistit informace o karyotypu těchto druhů: *Carinostoma carinatum*, *Centetostoma juberthiei*, *Centetostoma ventalloi*, *Histricostoma argenteolunulatum*, *Histricostoma dentipalpe*, *Mitostoma chrysomelas*, *Mitostoma pyrenaeum*, *Nemastoma dentigerum*, *Nemastoma lugubre*, *Nemastoma bidentatum bidentatum*, *Nemastoma b. gruberi*, *Nemastoma b. martensi*, *Nemastoma b. sparsum*, *Nemastomella bacillifera bacillifera* a *Paranemastoma quadripunctatum*. Pro každý druh byl určen diploidní počet chromozómů, zjištěná velikost chromozómů a umístění centromery (viz přílohy Tab. 3). Pomocí metody FISH byl u většiny druhů určen počet a pozice signálů klastrů 18S rDNA.

Carinostoma Kratochvíl & Miller, 1958

V rámci tohoto rodu byl analyzován jeden druh.

Carinostoma carinatum Roewer, 1914

Pro *C. carinatum* se podařilo získat 4 samce ze dvou lokalit z Itálie a Slovinska (Tab. 2 z příloh). Shodně mají všichni jedinci počet chromozómů $2n = 12$ (Obr. 5A). U obou populací byly zjištěny chromozómy se shodnými charakteristikami. Všechny chromozómy jsou metacentrické (Tab. 1). Charakteristický pro karyotyp *C. carinatum* je výrazně delší pár č. 1, který dosahuje relativní velikosti 23,20 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Všechny ostatní páry jsou již výrazně kratší a plynule zmenšují svoji velikost od 7,16 % HSCH do 3,87 % HSCH (Obr. 5E). Výrazně delší chromozómový pár během profáze prvního meiotického dělení vytváří vždy bivalenty s dvěma chiasmaty (Obr. 5B). Aplikace metody FISH zobrazila jeden pár signálu pro pozici klastru 18S rDNA. Tento signál se nachází poblíž centromery na kratším raménku u nejdelšího páru č. 1 (Obr. 5C, D).



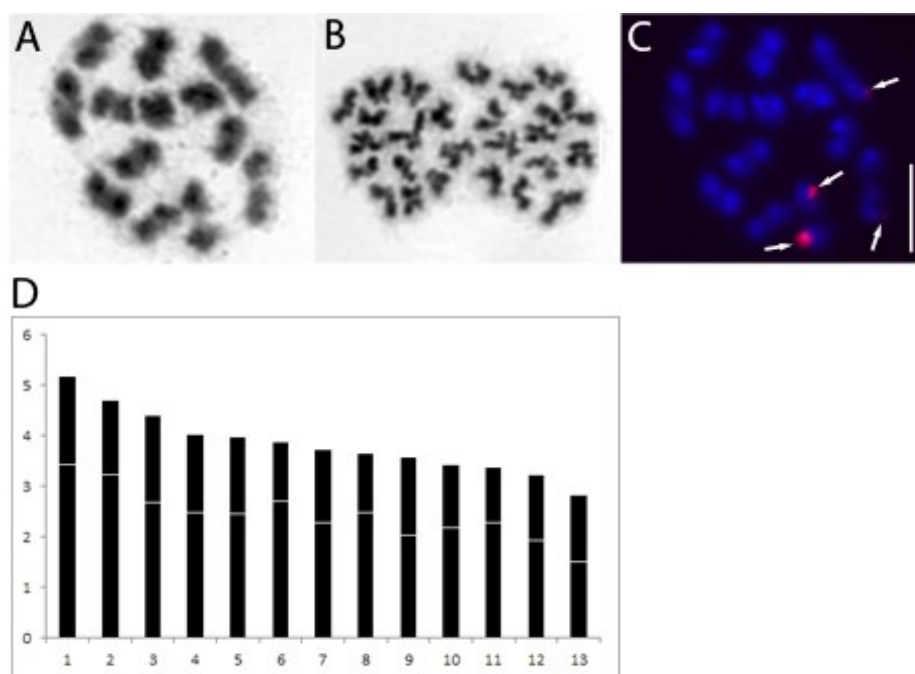
Obrázek 5: *Carinostoma carinatum* ($2n = 12$). A – mitotická metafáze; B – diakineze, černá šipka ukazuje na bivalent s dvěma chiasmaty; C–D diakineze (C) a mitotická metafáze (D) po aplikaci FISH, bílé šipky ukazují na pozici 18S rDNA, žlutá šipka ukazuje na bivalent s dvěma chiasmaty; E – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně označena pozice 18S rDNA. Měřítko = $10\mu\text{m}$.

Centetostoma Kratochvíl, 1958

Podařilo se získat cytogenetické údaje dvou druhů.

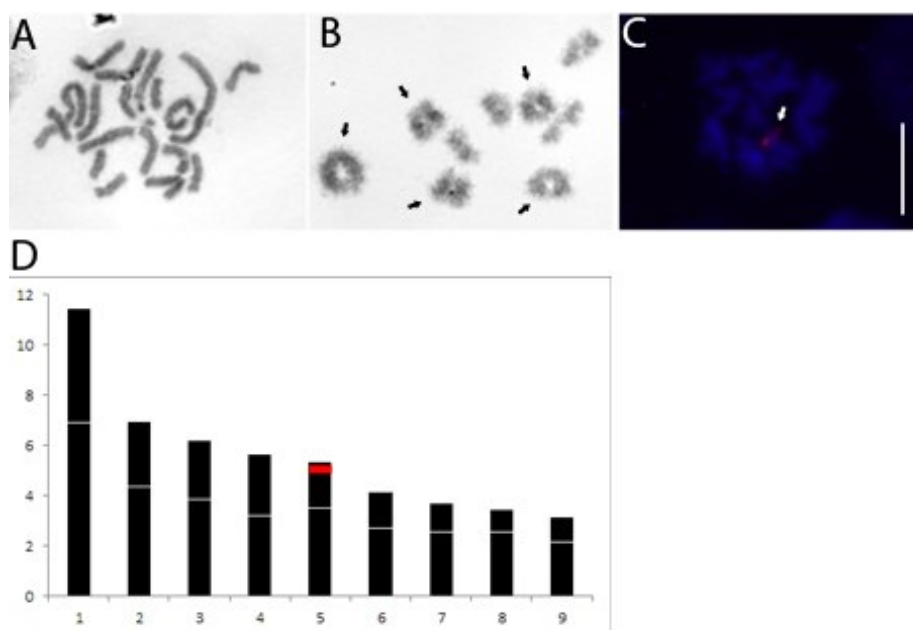
Centetostoma juberthiei Martens, 2011

U tohoto druhu se podařilo získat celkem tři samce z jedné lokality z Francie a po jednom samci z Andory a Španělska. Počet chromozómů je shodně pro všechny samce $2n = 26$ (Obr. 6A, B). Karyotyp zahrnuje pouze dvouramenné chromozómy: sedm párů metacentriků (páry č. 3- 5, 7, 9, 12, 13) a šest párů submetacentriků (páry č. 1, 2, 6, 8, 10, 11) (Tab. 1). Chromozómy plynule zmenšují svoji velikost od 5,19 % HSCH až po 2,83 % HSCH (viz přílohy Tab. 3), přičemž velikostní rozdíl mezi jednotlivými páry je maximálně 0,4 % (Obr. 6D). Během profáze prvního meiotického dělení byly pozorovány pouze bivalenty s jediným chiasmatem. FISH metoda zobrazila 4 terminální signály klastru 18S rDNA, přičemž jeden je párový a zbylé dva nepárové. Viditelné jsou rozdíly v síle signálu mezi párovým a nepárovými signály (Obr. 6C). Bohužel se nepodařilo přesně určit, které chromozómové páry nesou signály.



Obrázek 6: *Centetostoma juberthiei* ($2n = 26$). A – počátek metafáze I; B – metafáze II dvou dceřiných jader; C – profáze po FISH, bílé šipky ukazují na pozici 18S rDNA; C – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady. Měřítka = 10 μ m.

U všech zástupců *Centetostoma ventalloi* byl zjištěn shodně diploidní počet chromozómů 18 (Obr. 7A). Karyotyp zahrnuje pouze dvouramenné chromozómy: tři páry metacentriků (páry č. 1, 2, 4) a šest párů submetacentriků (páry č. 3, 5, 7-9) (Tab. 1). Pár č. 1 tvoří 11,56 % HSCH a je výrazně delší než ostatní páry. Následující páry č. 2, 3, 4, 5 (od 6,36 % do 5,35 % HSCH) jsou si velikostně blízké s rozdíly mezi nimi od 0,12 % po 0,59 % celkové délky haploidní sady (viz přílohy Tab. 3). Zbylé páry zmenšují plynule svoji velikost od 4,16 % do 3,2 % HSCH (Obr. 7D). Během profáze prvního meiotického dělení bylo pozorováno zvýšené množství chiazmat. Dvě chiazmata byla detekována nejen v rámci bivalentu nejdelšího páru chromozómů, ale také až pěti dalších chromozómových párů (Obr. 7B). Podařil se detekovat jeden pár signálu klastru 18S rDNA pomocí FISH. Tento signál je lokalizován na termální části kratšího raménka u páru č. 5 (Obr. 7C).



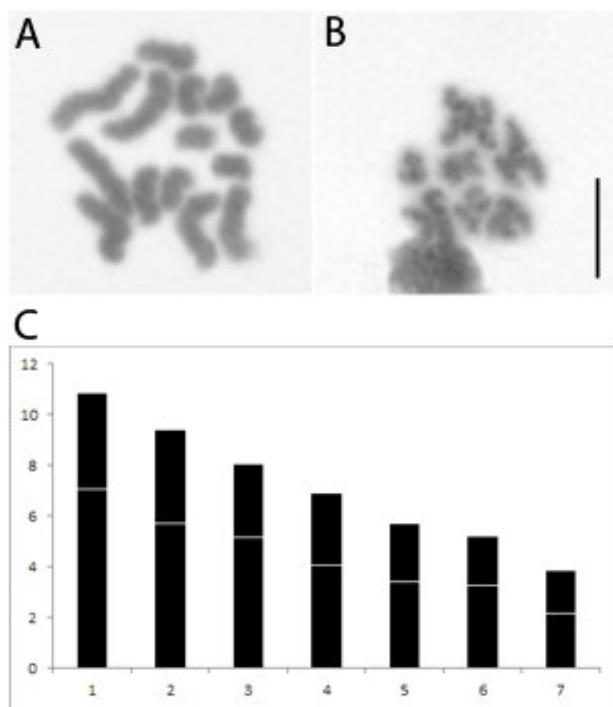
Obrázek 7: *Centetostoma ventalloi* ($2n = 18$). A – mitotická metafáze; B – metafáze II u jednoho dceřiného jádra; C – metafáze II u jednoho dceřiného jádra po FISH, bílé šipky ukazují na pozici 18S rDNA; D – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady červeně je označena pozice 18S rDNA. Měřítko = 10 μ m.

Histricostoma Kratochvíl, 1958

Pro tento rod se podařilo popsat karyotypy dvou druhů.

Histricostoma argenteolunulatum Canestrini, 1875

Cytogenetická analýza u tohoto druhu byla provedena na základě jednoho samce z Itálie a prokázala diploidní počet 14 (Obr. 8A). Analýza chromozómů v rámci metafáze II (Obr. 8B) prokázala převahu dvouramenných chromozómů: čtyři páry metacentriků (páry č. 2, 4, 5, 7) a tři páry submetacentriků (páry č. 1, 3, 6) (Tab. 1). Chromozómy plynule zmenšují svoji velikost od 10,84 % HSCH po 3,87 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Rozdíly v relativní velikosti v haploidní sadě jsou mezi jednotlivými páry podobné (0,5 % až 1,4 %) (Obr. 8C). Bohužel se u tohoto druhu nepodařilo zjistit počet chiazmat ani úspěšně aplikovat FISH pro detekci 18S rDNA.



Obrázek 8: *Histricostoma argenteolunulatum* ($2n = 14$). A – mitotická metafáze; B – jedno dceřiné jádro metafáze II; C – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

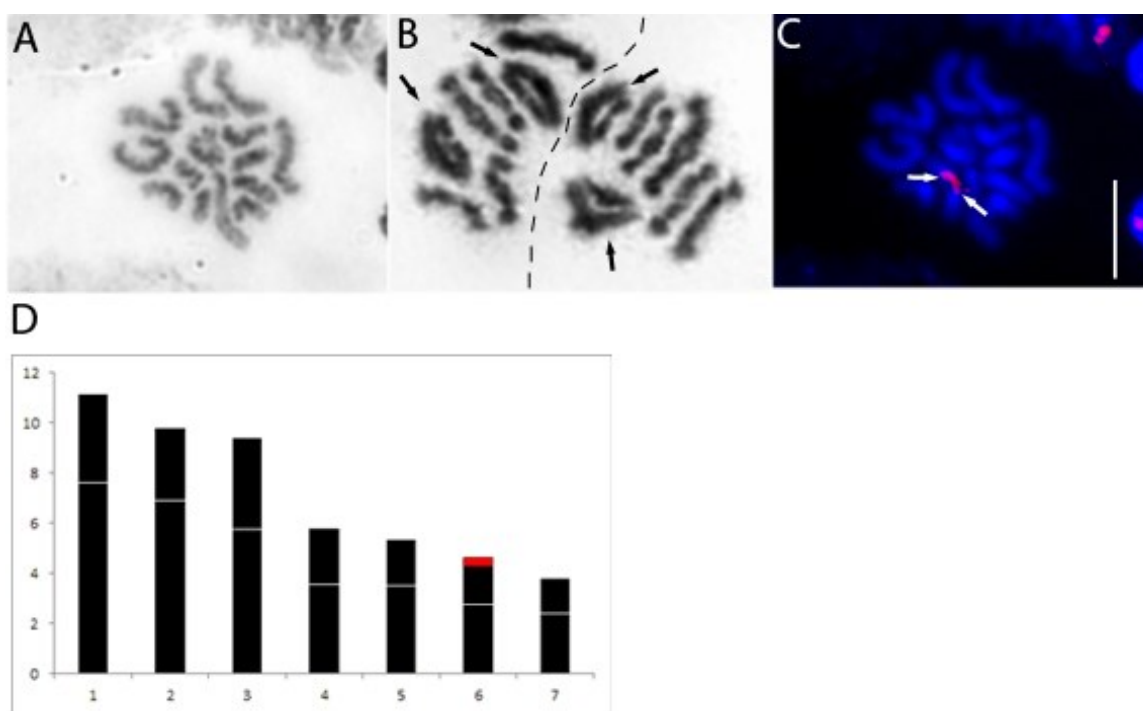
Na základě analýzy celkem 10 samců a 2 samic se podařilo u *H. dentipalpe* zjistit přítomnost dvou odlišných cytotypů lišících se v diploidním počtu chromozómů. Na lokalitách Col de Turini (Francie) a Monesi di Triora (Itálie) byl zjištěn počet $2n = 14$. Ostatní zkoumané lokality odhalily počet chromozómů $2n = 16$ (Obr. 9). Cytotypy se mezi sebou kromě diploidního počtu liší i výskytem rozdílného počtu chiazmat. U obou cytotypů byla zjištěna stejná lokalizace jednoho páru klastru 18S rDNA, které se nachází na terminální části šestého páru chromozómu.



Obrázek 9: Zjištěný výskyt dvou cytotypů druhu *Histricostoma dentipalpe*, fialová kolečka představují lokality cytotypu 1 s $2n = 14$; modrá kolečka představují lokality cytotypu 2 s $2n = 16$.

Cytotyp 1

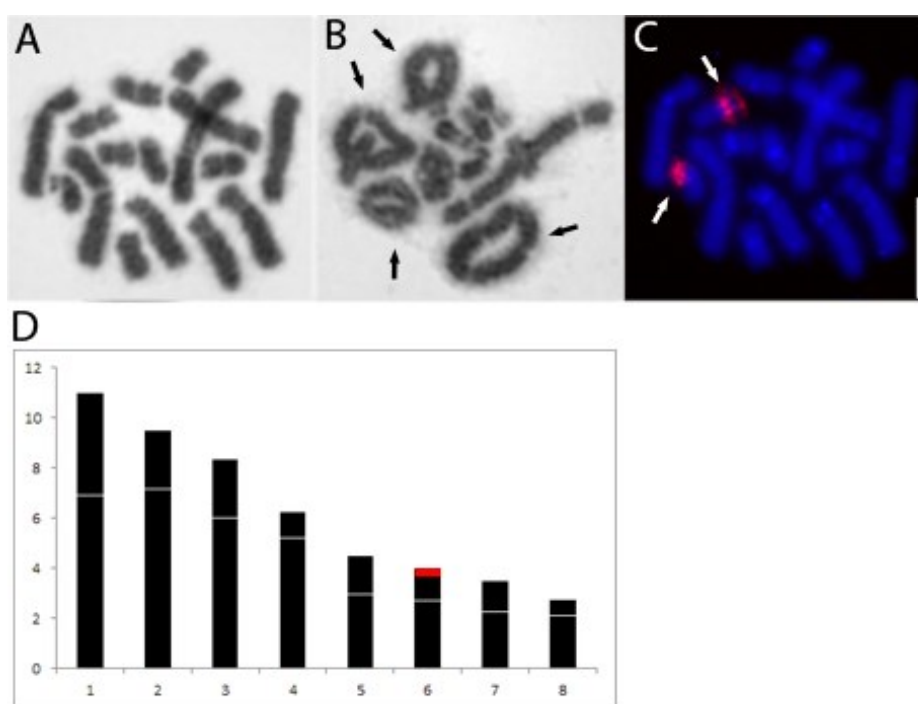
Pro cytotyp 1 jsou k dispozici údaje od 4 samců ze dvou lokalit. Jak již bylo zmíněno, pro tento cytotyp 1 je charakteristický počet chromozómů $2n = 14$ (Obr. 10A). Chromozómy se dělí na dva morfologické typy: tři metacentrické páry (páry č. 3, 4, 6) a čtyři submetacentrické (páry č. 1, 2, 5, 7) (Tab. 1). Charakteristický pro cytotyp 1 jsou první tři delší páry chromozómů s relativní velikostí 11,16 % - 9,42 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Zbylé 4 páry jsou viditelně kratší a plynule zmenšují svoji velikost od 5,83 % do 3,8 % HSCH (Obr. 10D). U tohoto cytotypu byl v diakinezi pozorován výskyt dvou bivalentů se dvěma chiazmaty (Obr. 10B). Po aplikaci FISH byl úspěšně lokalizován jeden pár signálu klastru 18S rDNA, který se nachází na 6. páru konkrétněji na kratším raménku v terminální oblasti (Obr. 10C).



Obrázek 10: *Histricostoma dentipalpe* cytotyp 1 ($2n = 14$). A – mitotická metafáze; B – diakineze, černé šipky ukazují na bivalenty s dvěma chiazmaty, přerušovaná čára odděluje dvě různé diakineze; C – mitotická metafáze po FISH, bílé šipky ukazují pozici 18S rDNA; D – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červené je označena oblast 18S rDNA. Měřítka = 10 μ m.

Cytotyp 2

Celkem 2 samice a 6 samců *Histricostoma dentipalpe* bylo identifikováno s cytotypem 2. Diploidní počet chromozómů je pro tento cytotyp 16 (Obr. 11A). Všechny páry jsou dvouramenné: pět páru je submetacentrických (páry č. 1, 3, 5-7) a tři páry subtelocentrické (páry č. 2, 4, 8) (Tab. 1). Relativní velikost chromozómů haploidní sady u největšího páru činí 11,01 % (viz přílohy Tab. 3). Další páry postupně klesají na velikosti v rozmezí od 9,5 % pro pár č. 2 až po 2,79 % pro pár č. 8 (Obr. 11D). Během diakineze byly zpozorovány 4 bivalenty s dvěma chiazmaty (Obr. 11B). Podobně jako u cytotypu 1 byl po použití FISH lokalizován jeden pár signálu klastru 18S rDNA na terminální části kratšího raménka 6. páru (Obr. 11C).



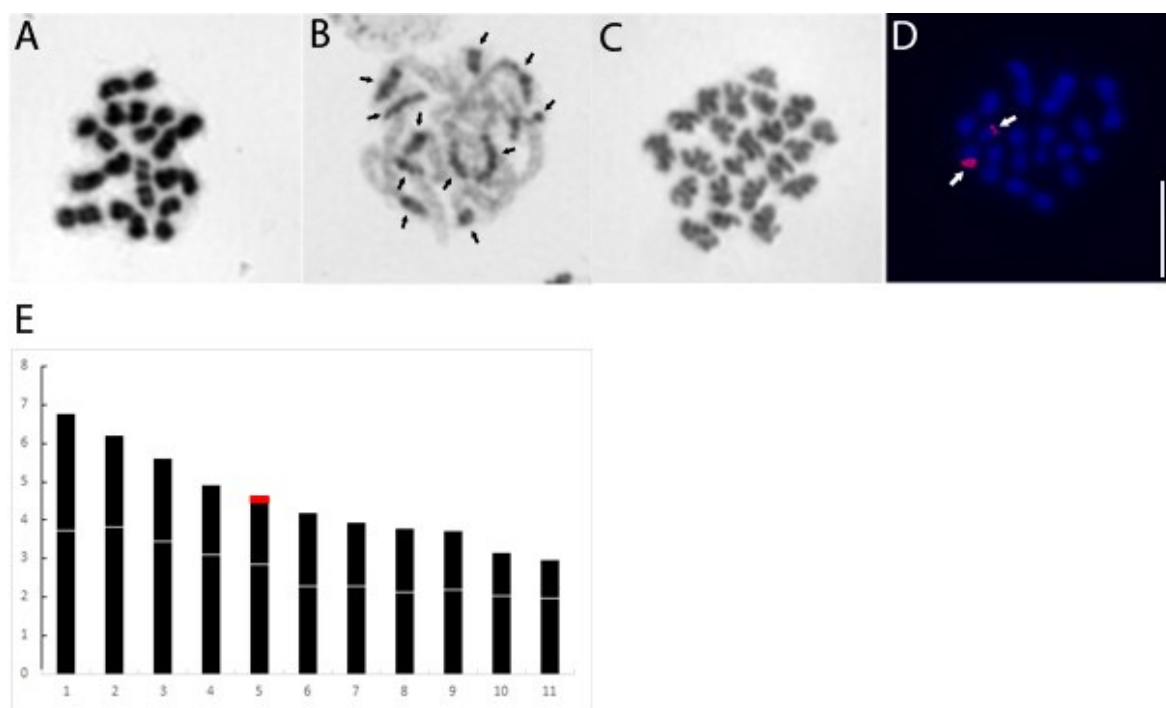
Obrázek 11: *Histricostoma dentipalpe* cytotyp 2 ($2n = 16$). A – Mitotická metafáze; B – Diakineze, černé šipky ukazují na bivalenty s dvěma chiazmaty; C – Mitotická metafáze po FISH, bílé šipky ukazují na pozici 18S rDNA; D – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně je označena pozice 18S rDNA. Měřítko = 10 μ m.

Mitostoma Roewer, 1951

Pro tento rod se podařilo získat cytogenetické údaje od zástupců dvou druhů.

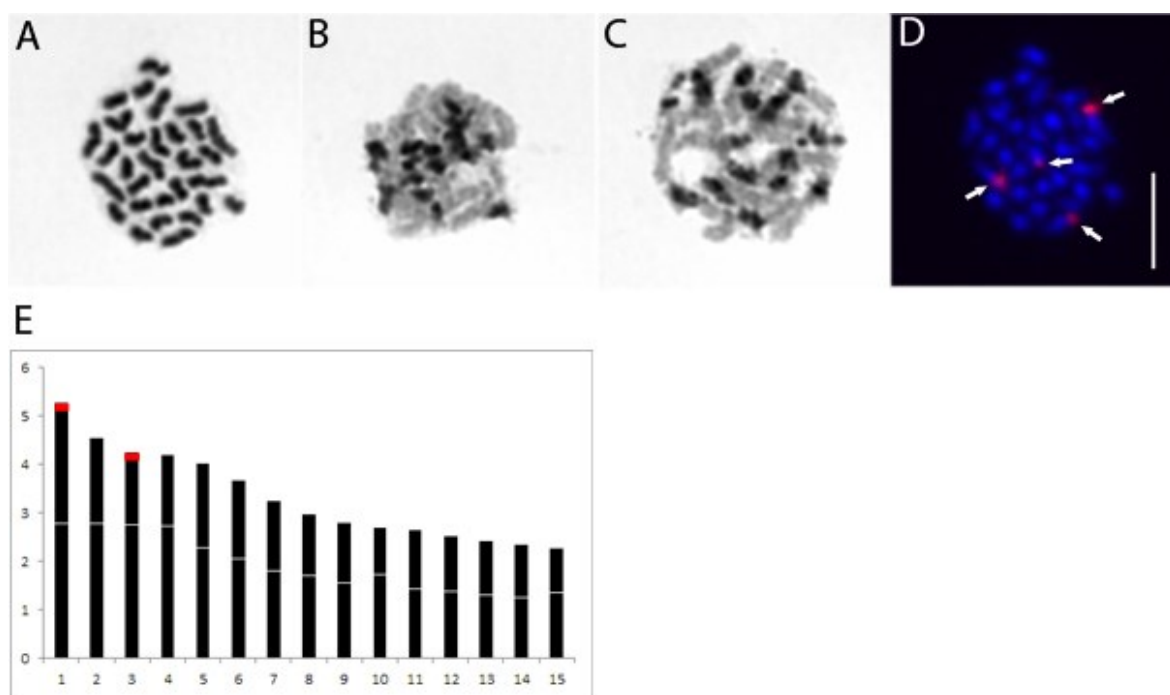
Mitostoma chrysomelas Hermann, 1804

Sběry *M. chrysomelas* pochází ze 4 lokalit reprezentující 5 samců a 1 samici, přičemž všichni jedinci mají diploidní počet chromozómů 22 (Obr. 12A, C). V karyotypu tohoto druhu se nachází pouze dvouramenné chromozómy, které jsou buď metacentrické (páry č. 1, 3, 6- 9) nebo submetacentrické (páry č. 2, 4, 5, 10, 11) (Tab. 1). Nejdelší z nich dosahuje 6,79 % HSCH a další páry plynule zmenšují svoji velikost až po 2,97 % HSCH (Obr. 12E). Variabilita ve velikostních rozdílech mezi jednotlivými páry je od 0,08 % HSCH mezi páry č. 8 a 9 až po 3,82 % HSCH mezi páry č. 1 a 11 (viz přílohy Tab. 3). Během zygotene byly pozorovány výrazně heteropyknotické bloky (Obr. 12B). V profázi prvního meiotického dělení byly pozorovány pouze bivalenty s jediným chiasmatem. Po aplikaci FISH se podařilo úspěšně lokalizovat jeden pár signálu klastru 18S rDNA, a to na termální pozici krátkého raménka u páru č. 5 (Obr. 12D).



Obrázek 12: *Mitostoma chrysomelas* ($2n = 22$). A – metafáze I; B – zygotene, černé šipky ukazují na výrazně heteropyknotické bloky; C – metafáze II; D – metafáze II po FISH, bílé šipky ukazují pozici klastru 18S rDNA; E – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady červeně je označena pozice 18S rDNA. Měřítko = 10 μ m.

Přestože se u *M. pyrenaeum* podařilo získat cytogenetické údaje od jediného zástupce z Francie, tak je patrné, že diploidní počet chromozómů je 30 (Obr. 13A). V karyotypu se nachází dvouramenné chromozómy, většina z nich je metacentrických (páry č. 1, 2, 5- 9, 11- 15), zbylé tři páry jsou submetacentrické (páry č. 3, 4, 10) (Tab. 1). Největší pár pro tento karyotyp je pár č. 1 s 5,29 % HSCH, zbylé páry postupně klesají ve velikosti od 4,55 % do 2,28 % HSCH (viz přílohy Tab. 3) (Obr. 13E). Během zygotene byly pozorovány pozitivně heteropyknotické bloky (Obr. 13B, C). U tohoto druhu byly pozorovány bivalenty s jedním chiazmatem. Pro *M. pyrenaeum* se podařilo v mitotické metafázi lokalizovat dva páry signálů klastru 18S rDNA (Obr. 13D). Tyto signály se nachází na terminální části kratších ramének u párů č. 1 a 3. Intenzita signálu se liší, u páru č. 1 je výraznější.



Obrázek 13: *Mitostoma pyrenaeum* ($2n = 30$). A – mitotická metafáze; B, C – zygotene, tmavší části jsou pozitivně heteropyknotické bloky; D – mitotická metafáze po FISH, bílé šipky ukazují na signál klastru 18S rDNA; E – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně je označena pozice 18S rDNA. Měřítka = 10 μ m.

Nemastoma C.L. Koch, 1836

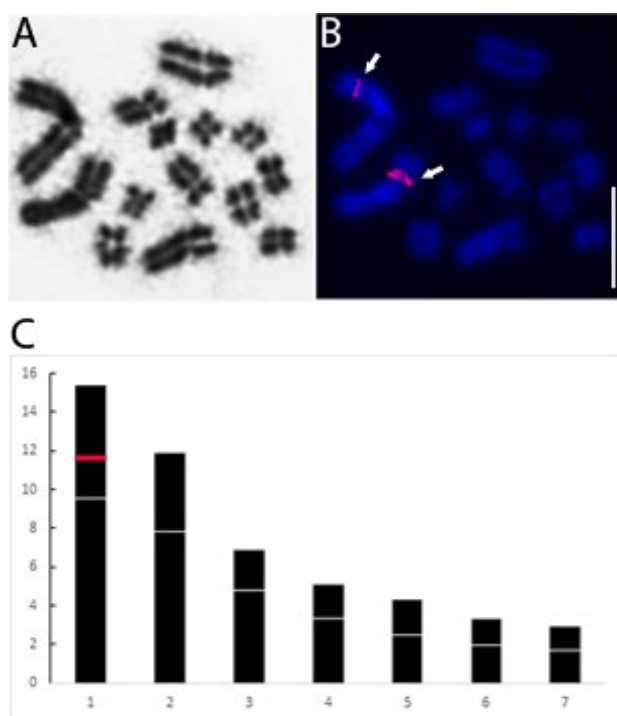
V rámci tohoto rodu se podařilo popsat karyotypy tří druhů.

Nemastoma bidentatum Roewer, 1914

U tohoto druhu jsem se soustředil na analýzu 4 poddruhů *N. b. bidentatum*, *N. b. gruberi*, *N. b. martensi* a *N. b. sparsum*, převážně ze Slovinska.

Nemastoma bidentatum bidentatum Roewer, 1914

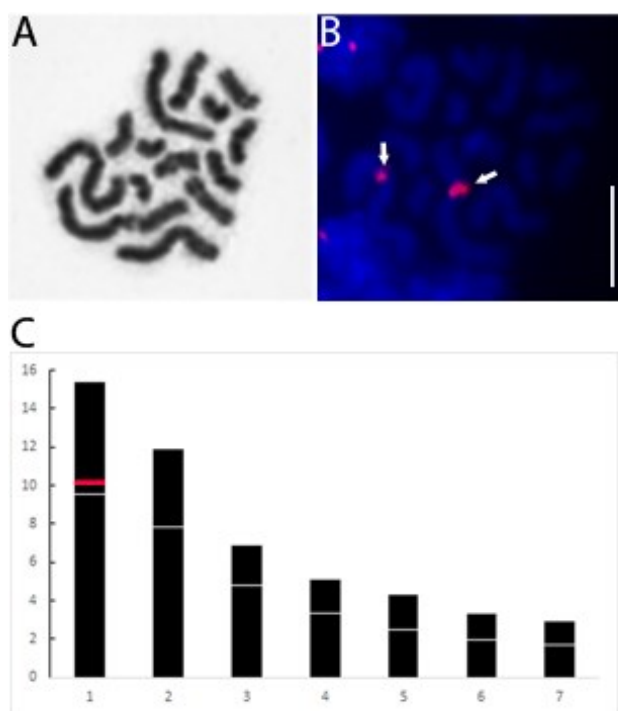
Pro *N. b. bidentatum* byla provedena analýza karyotypu u 4 samců z dvou lokalit ze Slovinska, všichni mají shodně diploidní počet chromozómů 14 (Obr. 14A). V karyotypu se nachází dvouramenné chromozómy, které jsou buď metacentrické (páry č. 5- 7) nebo submetacentrické (páry č. 1- 4) (Tab. 1). Výrazné jsou dva nejdelší páry (páry č. 1, 2), které mají 15,44 % respektive 11,94 % HSCH (Obr. 14C). Zbylé páry postupně zmenšují svoji velikost od 6,88 % do 2,92 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Po aplikaci FISH se podařilo lokalizovat jeden pár signálu klastru 18S rDNA (Obr. 14B). Signál byl lokalizován na intersticiální části krátkého raménka u nejdelšího páru chromozómů (pár č. 1).



Obrázek 14: *Nemastoma bidentatum bidentatum* ($2n = 14$). A – mitotická metafáze; B - mitotická metafáze po použití FISH, bílé šipky ukazují na signál klastru 18S rDNA; C - Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně je označena pozice 18S rDNA. Měřítko = 10 μ m.

Nemastoma bidentatum gruberi

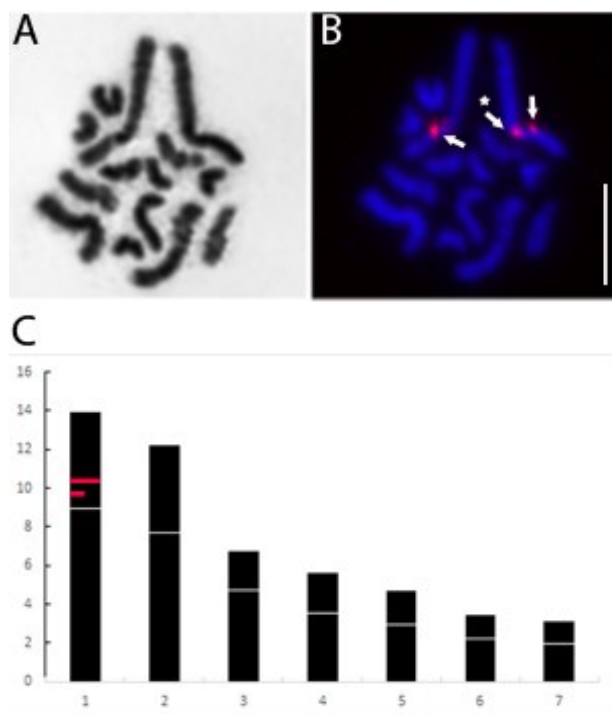
U tohoto druhu byli nasbíráni 3 samci z jedné lokality ze Slovinska. U všech 3 samců byl zjištěn shodně diploidní počet chromozómů 14 (Obr. 15A). V karyotypu se nachází dvouramenné chromozómy. Jediný pár je metacentrický (pár č. 7), zatímco zbytek párů je submetacentrický (páry č. 1- 6) (Tab. 1). Výrazné jsou dva nejdelší páry (páry č. 1, 2), které mají 15,09 %, respektive 10,68 % HSCH (Obr. 15C). Zbylé páry postupně zmenšují svoji velikost od 7,40 % do 2,93 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Po aplikaci FISH se podařilo lokalizovat jeden pár signálu klastru 18S rDNA (Obr. 15B). Signál byl lokalizován poblíž centromery krátkého raménka u nejdelšího páru chromozómů (pár č. 1).



Obrázek 15: *Nemastoma bidentatum gruberi* ($2n = 14$). A – mitotická metafáze; B – mitotická metafáze po použití FISH, bílé šipky ukazují na signál klastru 18S rDNA; C – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně je označena pozice 18S rDNA. Měřítko = 10 μ m.

Nemastoma bidentatum martensi

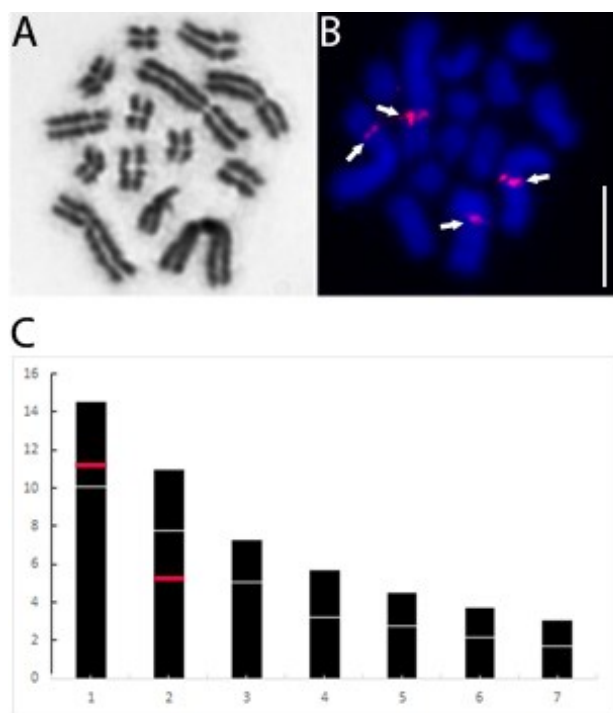
Pro *N. b. martensi* byla provedena analýza karyotypu u 4 samců z jedné lokality ze Slovinska, všichni mají shodně diploidní počet chromozómů 14 (Obr. 16A). Karyotyp u tohoto druhu je složen z dvouramenných chromozómů, které jsou všechny submetacentrické (Tab. 1). Výrazné jsou dva nejdelší páry (páry č. 1, 2), které mají 13,97 %, respektive 12,26 % HSCH (Obr. 16C). Zbylé páry postupně zmenšují svoji velikost od 6,80 % do 3,12 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Po aplikaci FISH se podařilo lokalizovat tři signály klastru 18S rDNA (Obr. 16B). Dva signály jsou párové nacházející se poblíž centromery krátkého raménka u nejdelšího páru chromozómů (pár č. 1). Třetí signál je nepárový a nachází se pouze u jednoho chromozómu nejdelšího páru (pár č. 1) poblíž párového signálu.



Obrázek 16: *Nemastoma bidentatum martensi* ($2n = 14$). A – mitotická metafáze; B – mitotická metafáze po použití FISH, bílé šipky ukazují na párový signál klastru 18S rDNA, šipka s hvězdičkou ukazuje na nepárový signál; C – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně je označena pozice 18S rDNA. Měřítko = 10 μ m.

Nemastoma bidentatum sparsum

U *N. b. martensi* se podařilo nasbírat 5 samců ze dvou lokalit z České republiky a jedné lokality ze Slovinska. Všichni jedinci mají shodně diploidní počet chromozómů 14 (Obr. 17A). Karyotyp u tohoto druhu je složen ze dvouramenných chromozómů, které jsou buď metacentrické (páry č. 4- 7) nebo submetacentrické (páry č. 1- 3) (Tab. 1). Výrazné jsou dva nejdelší páry (páry č. 1, 2), které mají 14,55 %, respektive 11,02 % HSCH (Obr. 17C). Zbylé páry postupně zmenšují svoji velikost od 7,31 % do 3,10 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Po aplikaci FISH se podařilo lokalizovat dva páry signálů klastru 18S rDNA (Obr. 17B). Jeden pár se nachází poblíž centromery krátkého raménka u nejdelšího páru chromozómů (pár č. 1). Druhý pár signálů byl lokalizován přibližně uprostřed 2. páru chromozómů a jeví stejnou sílu signálu jako pár první.

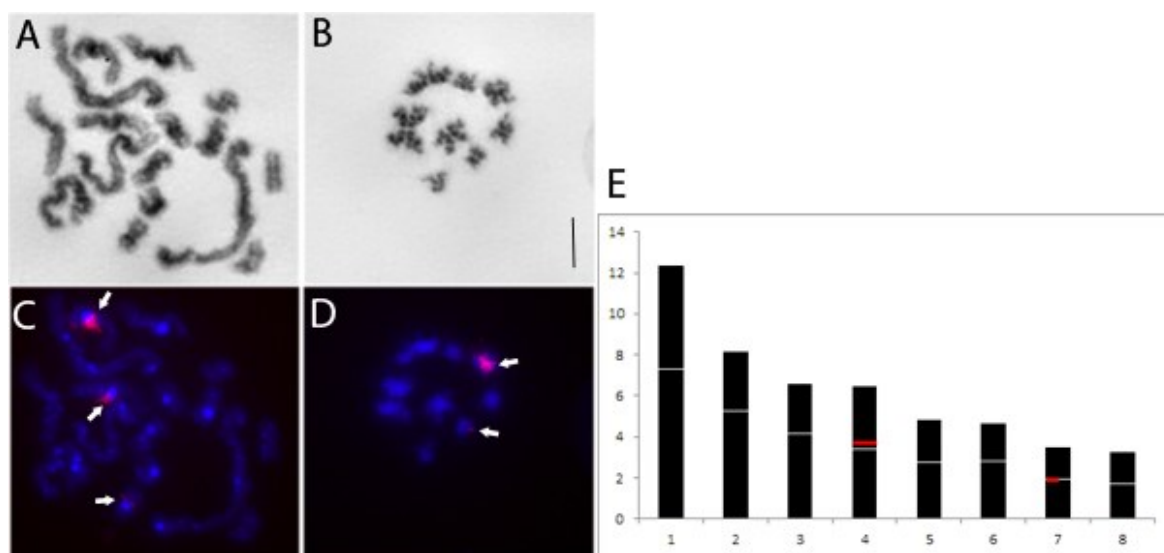


Obrázek 17: *Nemastoma bidentatum sparsum* ($2n = 14$). A – mitotická metafáze; B - mitotická metafáze po použití FISH, bílé šipky ukazují na signál klastru 18S rDNA; C - Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně je označena pozice 18S rDNA. Měřítko = 10 μ m.

V rámci tohoto druhu byli analyzováni celkem 4 samci a 1 samice. Sběry pochází ze dvou různých lokalit v severní Itálii. U všech analyzovaných jedinců byl zjištěn shodně počet chromozómů $2n = 16$. Po aplikaci FISH však byly zjištěny rozdíly v počtu a lokalizaci 18S rDNA mezi jednotlivými populacemi, a proto jsou výsledky podle nich rozděleny.

Populace 1

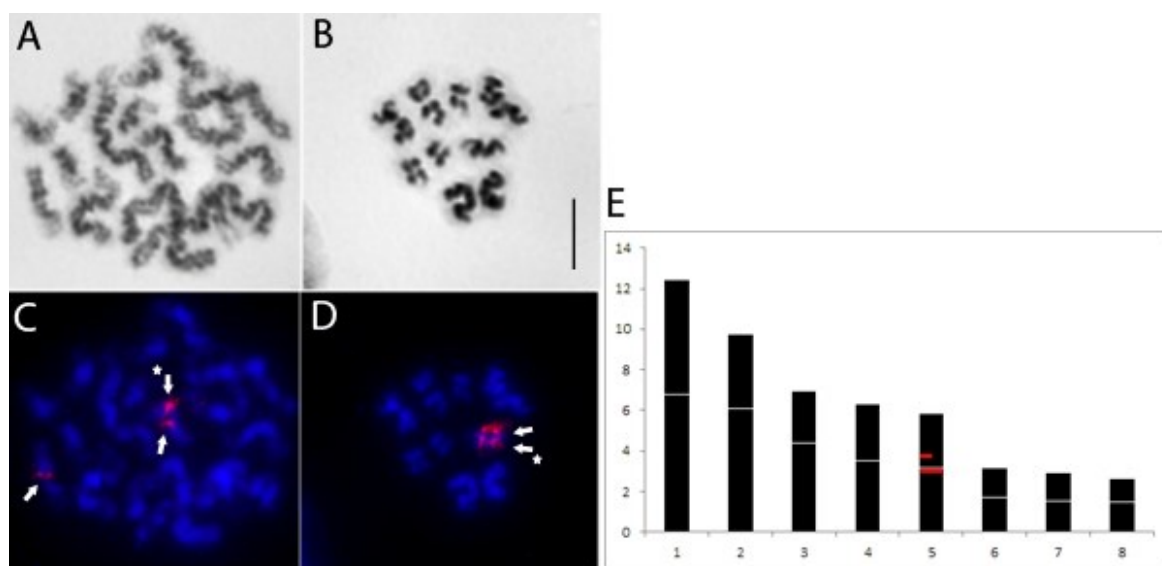
Jak bylo zmíněno výše, diploidní počet u všech jedinců na lokalitě Puria je 16 (Obr. 18A). Všechny chromozómy jsou dvouramenné, buď metacentrické (páry č. 1, 4, 5, 7) nebo submetacentrické (páry č. 2, 3, 6, 8) (Tab. 1). V karyotypu se vyskytuje jeden výrazně delší pár (pár č. 1), který má velikost 12,38 % HSCH. Následující pár č. 2 je výrazně menší s celkovou relativní délkou 8,2 % HSCH a další páry postupně zmenšují velikost až po 3,27 % HSCH (Obr. 18E). Rozdíl velikostí mezi ostatními těmito páry není příliš výrazný (0,08 – 1,66 %) (viz přílohy Tab. 3). Po aplikaci metody FISH byly zobrazeny 3 klastry signálu 18S rDNA (Obr. 18 C, D). Jeden je párový nacházející se poblíž centromery obou chromozómů páru č. 4. Třetí signál je ovšem nepárový a nachází se poblíž centromery pouze jednoho chromozómu páru č. 7.



Obrázek 18: *Nemastoma dentigerum* populace 1 ($2n = 16$). A – mitotická metafáze; B – metafáze II jednoho dceřiného jádra; C, D – fáze po použití FISH, bílé šipky ukazují na signál klastru 18S rDNA; E – Ideogram, červeně jsou označeny pozice NORů. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítka = 10 μ m.

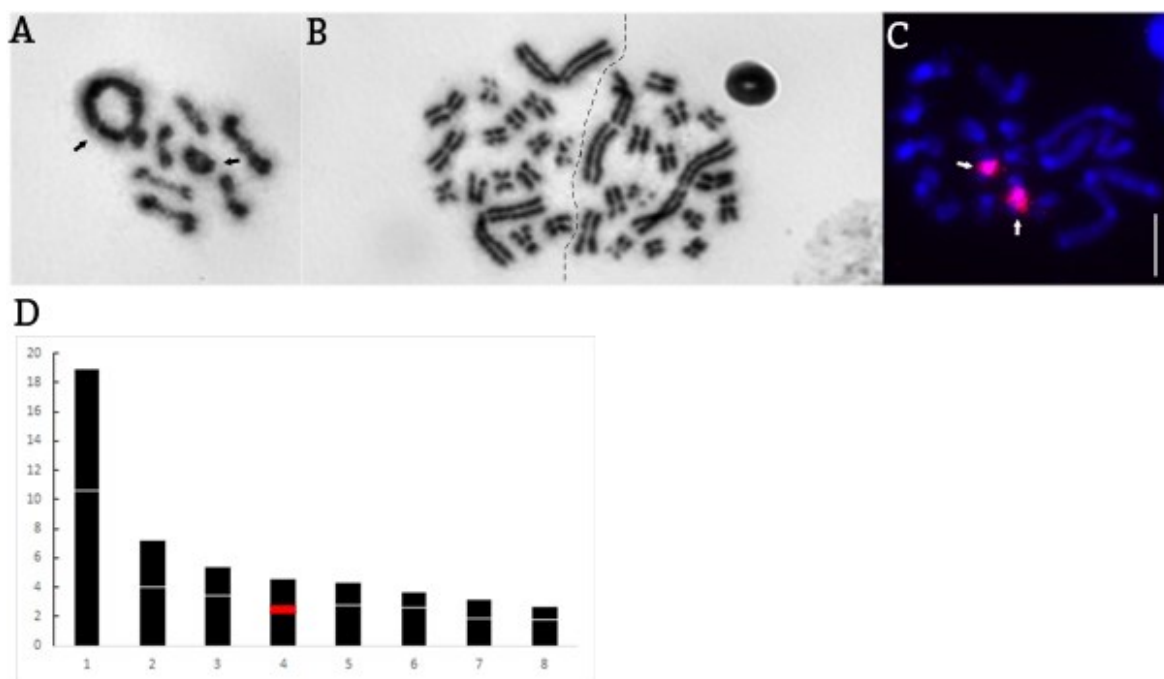
Populace 2

Diploidní počet chromozómů u samců v rámci této populace na lokalitě Loreglia je 16 (Obr. 19A). Morfologicky jsou všechny chromozómy v karyotypu dvouramenné s výskytem metacentrických (páry č. 1, 4, 5, 7) i submetacentrických chromozómů (páry č. 2, 3, 6, 8) (Tab. 1). Shodně s předchozí populací se i zde nachází jeden výrazně větší pár chromozómů (pár č. 1), který dosahuje relativní velikosti 12,46 % haploidní sady. Druhý pár pak následně klesá ve velikosti o 2,71 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Podobně tomu tak je i u páru č. 3, který klesá o 2,78 % HSCH. Větší rozdíl v relativní velikosti se vyskytuje mezi páry č. 5 a 6 (2,69 %). Nejmenší pár č. 8 dosahuje velikosti 2,65 % HSCH (Obr. 19E). Rozdíl mezi populací 1 a populací 2 *Nemastoma dentigerum* činí v pozici klastrů 18S rDNA. Za použití FISH se podařilo lokalizovat 3 signály klastru 18S rDNA. Všechny signály jsou na chromozómovém páru č. 5. Párový signál se vyskytuje blíže k centromere u daného chromozómu. Třetí signál, který není párový, se nachází zhruba uprostřed krátkého raménka páru č. 5 (Obr. 19C, D).



Obrázek 19: *Nemastoma dentigerum* populace 2 ($2n = 16$). A – mitotická metafáze; B – metafáze II jednoho dceřiného jádra; C, D – fáze po použití FISH, bílé šipky ukazují na párový signál klastru 18S rDNA, šipka s hvězdičkou ukazuje na nepárový signál; E – Ideogram, červeně jsou označeny pozice NORů. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítka = 10 μ m.

U tohoto druhu se podařilo úspěšně analyzovat materiál ze dvou lokalit ze Švýcarska a z čtyř lokalit z České republiky. U všech zkoumaných jedinců je shodný počet chromozómů $2n = 16$ (Obr. 20B). V karyotypu se vyskytují pouze dvouramenné chromozómy, které jsou buď metacentrické (páry č. 1, 2, 4, 7) nebo submetacentrické (páry č. 3, 5, 6, 8) (Tab. 1). Charakteristickým pro karyotyp *Nemastoma lugubre* je výrazně delší pár č. 1, který má relativní velikost v haploidní sadě 18,93 % (Obr. 20D). Ostatní chromozómy zmenšují plynule svoji velikost od 7,27 % do 2,66 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). V diakinezi byly pozorovány dva bivalenty s dvěma chiazmaty (Obr. 20A). Pomocí metody FISH byl detekován jeden pár signálu klastru genu 18S rDNA v blízkosti centromery na delším raménku páru č. 4 (Obr. 20C).



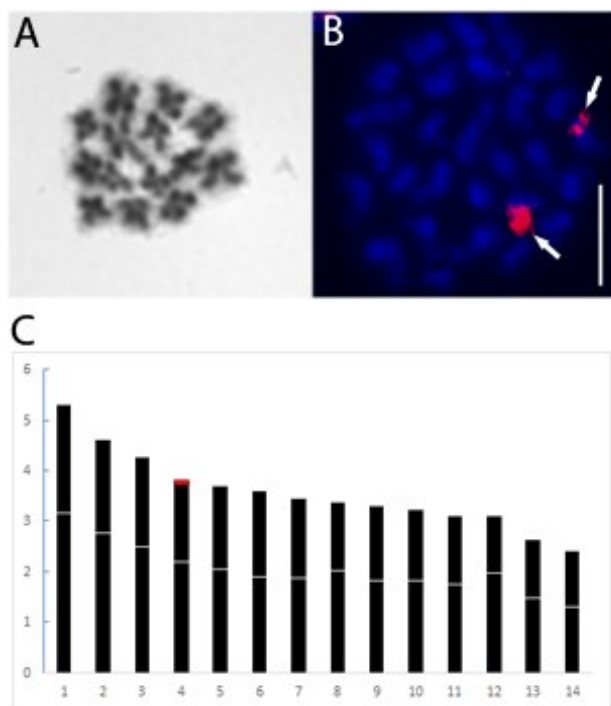
Obrázek 20: *Nemastoma lugubre* ($2n = 16$). A – Diakineze, černé šipky ukazují na bivalenty s dvěma chiazmaty; B – Dvě mitotické metafáze, přerušovaně jsou oddělená dvě jádra; C – Mitotická metafáze po aplikaci FISH, bílé šipky ukazují pozici NORů; D – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně znázorněna pozice NORu. Měřítko = 10 μ m.

Nemastomella Mello-Leitão, 1936

V rámci tohoto rodu se podařilo popsat karyotyp jednoho druhu.

Nemastomella bacillifera Simon, 1879

U druhu *N. bacillifera* se podařilo získat cytogenetické údaje od tří samců a dvou samic z jižní Francie. Všichni mají stejný diploidní počet chromozómů 28 (Obr. 21A). Analýza morfologie chromozómů ukázala výskyt pouze dvouramenných chromozómů. Všechny páry chromozómů jsou metacentrické až na pár č. 12, který je submetacentrický (Tab. 1). Největším chromozómem v karyotypu *Nemastomella bacillifera* je pár č. 1 s velikostí 5,31 % HSCH. Následující páry plynule zmenšují svojí velikost od 0,01 % do 0,47 % HSCH (viz přílohy Tab. 3). Páry č. 13 a 14 jsou nejmenší s velikostí 2,64 %, respektive 2,42 % HSCH (Obr. 21C). Bohužel se u tohoto druhu nepodařilo zjistit počet chiazmat. Po aplikaci FISH se podařilo lokalizovat jeden pár signálu 18S rDNA, který se nachází na terminální části páru č. 4 (Obr. 21B).



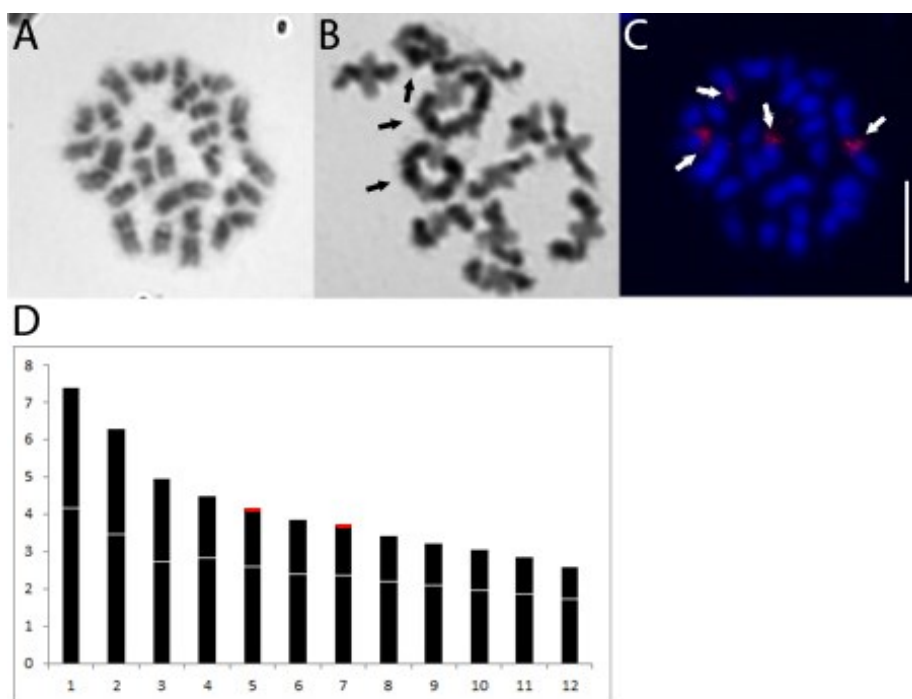
Obrázek 21: *Nemastomella bacillifera* ($2n = 28$). A – metafáze II u jednoho dceřiného jádra; B – mitotická metafáze po aplikaci FISH, bílé šipky ukazují na lokaci 18S rDNA; C – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady. Měřítka = 10 μ m.

Rod *Paranemastoma* Redikortsev, 1936

Podařilo se analyzovat karyotyp jediného druhu.

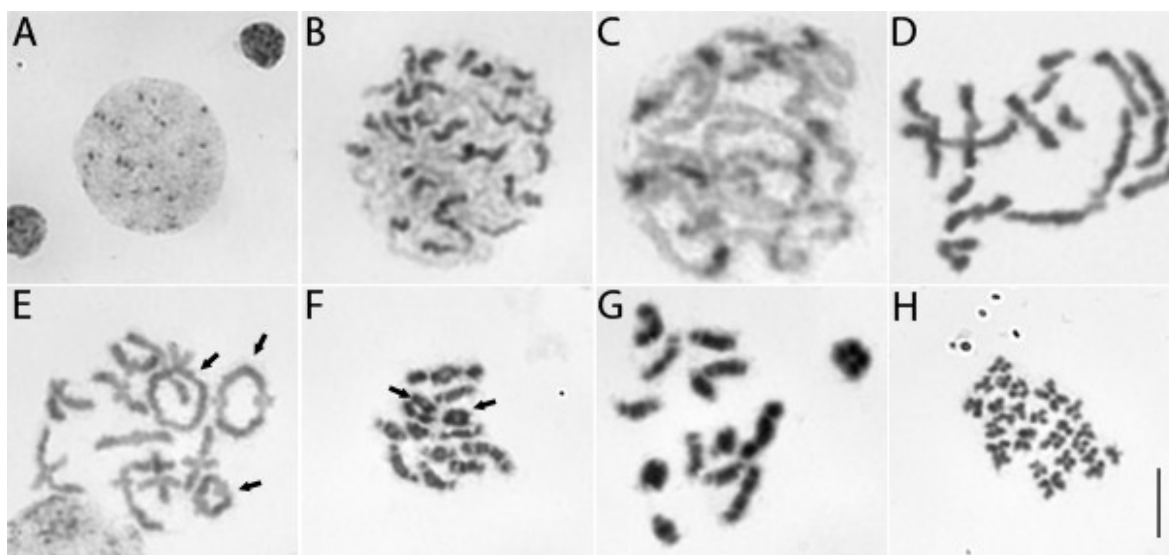
Paranemastoma quadripunctatum Perty, 1833

Všech 6 samců a 1 samice ze 4 lokalit mají shodně diploidní počet chromozómů 24 (Obr. 22A). Z morfologického hlediska lze v karyotypu nalézt dvouramenné chromozómy metacentrického (páry č. 1- 3) nebo submetacentrického typu (páry č. 4- 12) (Tab. 1). Rozdíly relativní velikosti v haploidní sadě jsou mezi jednotlivými páry poměrně malé od 0,13 % do 1,37 % (Obr. 22D) (viz přílohy Tab. 3). V diplotene se podařilo identifikovat celkem tři bivalenty se dvěma chiazmaty v terminální či subterminální pozici (Obr. 22B), nicméně se zdá, že počet chiazmat je u tohoto druhu variabilní. Dále u *Paranemastoma quadripunctatum* byla provedena metoda FISH, která odhalila dva páry signálu klastru 18S rDNA (Obr. 22C). Oba páry signálů se nachází na terminální části krátkého raménka u páru č. 5 a 7, a jsou stejně intenzivní.



Obrázek 22: *Paranemastoma quadripunctatum* ($2n = 24$). A – Mitotická metafáze; B – Diplotene, černé šipky zobrazují bivalenty, u kterých se vyskytují chiazmata; C – Mitotická metafáze po FISH, bílé šipky ukazují pozici 18S rDNA; D – Ideogram. Osa y = % z celkové haploidní sady, červeně je znázorněná pozice 18S rDNA. Měřítka = 10 μm .

Pro *Paranemastoma quadripunctatum* se podařilo zpozorovat detailněji jednotlivé fáze meiózy. Počínajícím stádiem je profáze (Obr. 23A), ve které dochází k přípravě na dělení jádra. Následující pozorovaná fáze byla zygotene, v rámci které byly patrné intenzivněji spiralizované úseky chromozómů, viditelné jako pozitivně heteropyknotické oblasti (Obr. 23B). V navazující fázi pachytene (Obr. 23C) pokračuje spiralizace chromozómů a finalizuje se párování homologických chromozómů. Jedná se o fázi, ve které jsou velmi dobře patrné pozitivní heteropyknotické bloky. Chiazmata vzniklá během pachytene jsou patrná v diplotene (Obr. 23D, E). V rámci *Paranemastoma quadripunctatum* byla pozorovaná variabilita počtu chiazmat, a to i v rámci jednotlivých jedinců. Některé diplotene obsahovaly pouze bivalenty s jedním chiazmatem (Obr. 23D). Popřípadě až u třech dlouhých párů chromozómů došlo v rámci bivalentů ke vzniku dvou chiazmat (Obr. 23E). V rámci diplotene je již spiralizace celých chromozómů tak intenzivní, že pozitivní heteropyknóza části chromozómů již není příliš zřetelná. Celý proces profáze je završen diakinezí (Obr. 23F), ve které se posouvají chiazmata na konec chromatid a postupně zanikají. S diakinezí se prolíná metafáze I (Obr. 23G), pro kterou je specifické napojení vláken dělicího vřeténka na centromery chromozómů. Centromery jednotlivých chromozómů bývají patrné v metafázi II (Obr. 23H), ve které se díky tomu dají dobře zjistit morfologické charakteristiky chromozómů.



Obrázek 23: Vybrané fáze meiózy u *Paranemastoma quadripunctatum* ($2n = 24$). A – interfáze; B – zygotene; C – pachytene; D – diplotene, všechny bivalenty pouze s jedním chiazmatem; E – diplotene, černé šipky ukazují bivalenty s dvěma chiazmaty; F – diakineze, černé šipky ukazují na bivalenty s dvěma chiazmaty; G – metafáze I; H – metafáze II, dvě dceřiná jádra. Měřítko = $10\mu\text{m}$.

Tabulka 1: Přehled cytogenetických výsledků analyzovaných žlaznatek seřazených od nejvyššího počtu chromozómů. Horní řada - čísla udávají jednotlivé páry chromozómů, 2n = diploidní počet chromozómů; zkratky: M – metacentrický chromozóm; SM – submetacentrický chromozóm; ST – subtelocentrický chromozóm; červeně jsou označeny páry na kterých se nachází signál klastru 18S rDNA.

Druh	2n	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
<i>Mitostoma pyrenaeum</i>	30	M	M	SM	SM	M	M	M	M	M	SM	M	M	M	M	M
<i>Nemastomella bacillifera</i>	28	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	SM	M	M	-
<i>Centetostoma juberthiei</i>	26	SM	SM	M	M	M	SM	M	SM	M	SM	SM	M	M	-	-
<i>Paranemastoma quadripunctatum</i>	24	M	M	M	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	-	-	-
<i>Mitostoma chrysomelas</i>	22	M	SM	M	SM	SM	M	M	M	M	SM	SM	-	-	-	-
<i>Centetostoma ventalloi</i>	18	M	M	SM	M	SM	SM	SM	SM	SM	-	-	-	-	-	-
<i>Histricostoma dentipalpe</i> cytotyp 2	16	SM	ST	SM	ST	SM	SM	SM	ST	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nemastoma dentigerum</i> populace 1	16	M	SM	SM	M	M	SM	M	M	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nemastoma dentigerum</i> populace 2	16	M	SM	SM	M	M	SM	M	M	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nemastoma lugubre</i>	16	M	M	SM	M	SM	SM	M	SM	-	-	-	-	-	-	-
<i>Histricostoma argenteolunulatum</i>	14	SM	M	SM	M	M	SM	M	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Histricostoma dentipalpe</i> cytotyp 1	14	SM	SM	M	M	SM	M	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nemastoma bidentatum bidentatum</i>	14	SM	SM	SM	SM	M	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nemastoma bidentatum gruberi</i>	14	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nemastoma bidentatum martensi</i>	14	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nemastoma bidentatum sparsum</i>	14	SM	SM	SM	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carinostoma carinatum</i>	12	M	M	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5. Diskuze

5.1. Karyotypová variabilita Nemastomatidae

V této diplomové práci jsem se zaměřil na cytogenetickou analýzu sekáčů z čeledi Nemastomatidae. Jmenovitě se podařilo zjistit údaje o karyotypech u 12 druhů patřících do 7 rodů: *Carinostoma carinatum*, *Centetostoma juberthiei*, *C. ventalloi*, *Histicostoma argenteolunulatum*, *H. dentipalpe*, *Mitostoma chrysomelas*, *M. pyrenaeum*, *Nemastoma bidentatum bidentatum*, *N. b. gruberi*, *N. b. martensi*, *N. b. sparsum*, *N. dentigerum*, *N. lugubre*, *Nemastomella bacillifera* a *Paranemastoma quadripunctatum*.

Doposud byly známé cytogenetické údaje o počtu chromozómů pouze u tří druhů žlaznatek: *Nemastoma dentigerum* ($2n = 16$) z Německa, *Nemastoma lugubre* ($2n = 16$) z Ruska a *Mitostoma chrysomelas* ($2n = 24$) z Rakouska (Sokolow 1929; Tsurusaki 2007). Výsledky této diplomové práce potvrzují diploidní počty u *Nemastoma dentigerum* i *Nemastoma lugubre* i přesto, že byli analyzováni jedinci z jiných lokalit (Itálie, respektive Česká republika a Švýcarsko). Bohužel originální publikace přináší údaje pouze o diploidním počtu chromozómů, a proto se případné rozdíly v ostatních charakteristikách chromozómů nedají porovnat. Oproti dříve publikovanému údaji byl v rámci diplomové práce zjištěn rozdílný počet chromozómů ($2n = 22$) u *Mitostoma chrysomelas* ze všech studovaných lokalit (Rakousko, Švýcarsko, Itálie). Avšak ani u tohoto druhu nejsou známy detaily v originální publikaci pro hlubší analýzu. Prvně je v této práci zaznamenán počet chromozómů u těchto druhů: *Carinostoma carinatum* $2n = 12$, *Centetostoma juberthiei* $2n = 26$, *C. ventalloi* $2n = 18$, *H. argenteolunulatum* $2n = 14$, *H. dentipalpe* cytotyp 1 $2n = 14$, *H. dentipalpe* cytotyp 2 $2n = 16$, *Mitostoma pyrenaeum* $2n = 30$, *Nemastoma bidentatum bidentatum* $2n = 14$, *N. b. gruberi* $2n = 14$, *N. b. martensi* $2n = 14$, *N. b. sparsum* $2n = 14$, *Nemastomella bacillifera* $2n = 28$, *Paranemastoma quadripunctatum* $2n = 24$. Současný známý rozsah počtu chromozómů z čeledi Nemastomatidae je tudíž $2n = 12-30$, což odpovídá dosavadním znalostem o podřádu Dyspnoi $2n = 10-28$ (Tsurusaki *et al.* 2018). Jedinou výjimkou je *Mitostoma pyrenaeum*, která s $2n = 30$ navyšuje zaznamenané maximum pro celý podřád. Zjištěný diploidní počet tohoto druhu navíc odpovídá současné představě o ancestrálním karyotypu sekáčů, který se předpokládá, že byl kolem 30 chromozómů (Svojanovská *et al.* 2016).

Mimo vlastní rozsah počtů chromozómů v rámci žlaznatek se také podařilo zjistit zřetelné mezidruhové rozdíly karyotypů u některých rodů. Poměrně výrazná je mezidruhoví variabilita jak v diploidním počtu, tak i ve velikosti chromozómů u rodu *Centetostoma*, konkrétně mezi druhy *C. ventalloi* a *C. juberthiei*. *C. ventalloi*, s nižším počtem chromozómů $2n = 18$, má výrazně zvětšený první pár chromozómů oproti *C. juberthiei* ($2n = 26$). Mezidruhoví variabilita byla zaznamenána i u rodu *Mitostoma*, kde *M. chrysomelas* s nižším počtem chromozómů $2n = 22$ má viditelně větší páry chromozómů oproti *M. pyrenaeum* ($2n = 30$). U žlaznatek je podobná velikostní diferenciací chromozómů u druhů s nižším počtem chromozómů typická. Nejvýraznější rozdíl mezi jednotlivými chromozómy jednoho druhu byl pozorován u *Carinostoma carinatum*, pro kterou je patrně větší první pár chromozómů (23,20 % HSCH) oproti druhému největšímu páru (7,16 % HSCH) (viz přílohy Tab. 3). S ohledem na předpokládaný ancestrální počet chromozómů kolem 30 se dají vysvětlit rozdíly karyotypů s menším diploidním počtem, možnými fúzemi jednotlivých chromozómů. Mezidruhoví variabilita se vyskytuje napříč celým řádem sekáčů. Jedním z příkladů je rod *Siro* (Cyphophthalmi: Sironidae), u kterého má druh *Siro rubens* Latreille, 1804 $2n = 30$ a druh *Siro carpaticus* Rafalski, 1956 $2n = 52$ (Svojanovská *et al.* 2016). Dalším příkladem mezidruhoví variability jsou někteří zástupci z cytogeneticky nejvíce prozkoumané čeledi Sclerosomatidae s rozsahem diploidního počtu 10- 48 (Tsurusaki *et al.* 2018). Stejně tak jsou rozdíly výrazné u čeledi Phalangiidae $2n = 16- 36$ (Tsurusaki 2007). U těchto skupin nicméně většinou nedochází během snižování počtu chromozómů k jejich výrazné velikostní diferenciaci a je tudíž zřejmé, že k předpokládaným fúzím chromozómů během evoluce karyotypů těchto čeledí dochází většinou mezi různými páry. Naproti tomu u žlaznatek často probíhá akumulace fúzí na jeden (či několik málo) pár chromozómů.

Co se týká variability zastoupení jednotlivých morfologických typů chromozómů v karyotypech tak v rámci podřádu Dyspnoi byly doposud publikované tyto údaje pouze u tří rodů *Sabacon*, *Ischyropsalis* a *Trogulus* Latreille, 1892 (Juberthei 1956, Tsurusaki 1989). Pouze u rodu *Trogulus* byl zaznamenán výhradně výskyt jednoramenných chromozómů. U zbylých rodů převažují dvouramenné metacentrické nebo submetacentrické chromozómy. Převaha dvouramenných chromozómů je běžná napříč celým řádem sekáčů (Tsurusaki 2007), až na *Trogulus nepaeformis* Scopoli, (1763) (Dyspnoi: Trogulidae) (Juberthei 1956) a rod *Siro* (Cyphophthalmi: Sironidae) s čistě akrocentrickými chromozómy (Svojanovská *et al.* 2016). Výsledky naměřené v této

diplomové práci odpovídají předpokladům o častém výskytu dvouramenných chromozómů u sekáčů, což bylo potvrzeno u všech zkoumaných druhů žlaznatek. Krom metacentrických a submetacentrických chromozómů byly zaznamenány subtelocentrické chromozómy u druhu *Histricostoma dentipalpe*, konkrétně cytotypu 2. Zkoumané žlaznatky mají jasně viditelnou centromeru v průběhu meiózy. Pouze u druhů s vyšším diploidním počtem tudíž menšími chromozómy jsou někdy obtížněji lokalizovatelné. Z dosavadních poznatků o rozdílech v počtu a morfologii chromozómů sekáčů se dají tyto údaje využít k odlišování jednotlivých druhů.

Zajímavým zjištěním této diplomové práce je možný výskyt vnitrodruhové variability u druhu *Histricostoma dentipalpe*, pro kterou byly zjištěny dva cytotypy. První cytotyp má počet chromozómů $2n = 14$ a nachází se u zkoumaných jedinců na hranicích Francie a Itálie poblíž Ligurského moře. Druhý cytotyp, který se zdá být častější, má počet chromozómů $2n = 16$, a vyskytuje se více ve vnitrozemí na území Itálie, Slovinska a Švýcarska (Obr. 9). Areály jednotlivých cytotypů se nepřekrývají, nicméně výskyt hybridních zón se nedá vyloučit. Rozdílná je i morfologická stavba chromozómů, kdy u cytotypu 1 je karyotyp složen metacentrickými a submetacentrickými páry chromozómů, zatímco u cytotypu 2 se vyskytují submetacentrické, ale i subtelocentrické páry. Možné vysvětlení se dá hledat u dalších druhů sekáčů, například výskyt vnitrodruhové variability byl zaznamenán i u *Sabacon makinoi* (Dyspnoi: Sabaconidae). Jedinci tohoto druhu mají rozsah počtu chromozómů $2n = 10-14$ v závislosti na geografické poloze s výskytem jak jednoramenných, tak dvouramenných chromozómů (Tsurusaki 1989). Pro tento druh se předpokládá, že původní karyotyp má diploidní počet chromozómů 14 a dochází zde k redukci počtu centrickou fúzí dvou akrocentrických chromozómů. Jedním z dalších možných mechanismů této redukce může být tandemová fúze nebo pericentrická inverze. Další vnitrodruhová variabilita byla zaznamenána u *Leiobunum montanum* Suzuki, 1953 ($2n = 16-24$) (Eupnoi: Sclerosomatidae). V tomto případě však jedinci nemají přítomny subtelocentrické nebo akrocentrické chromozómy, tudíž pouze centrické fúze nebo Robertsonianské translokace nevysvětlují variabilitu v počtech chromozómů (Tsurusaki 1985). Jedním z možných vysvětlení změny počtu chromozómů u tohoto druhu jsou pericentrické inverze následované fúzemi nebo štěpení s následnými inverzemi. Obdobná situace variability počtu chromozómů v rámci jediného druhu, a i dokonce jediného jedince se objevila u *Goniosoma spelaeum* (Laniatores: Gonyleptidae) s diploidním počtem

chromozómů 92- 109 (Oliveira *et al.* 2006). Zde se autor domnívá, že je evoluce chromozómů způsobena centrickým štěpením následované pericentrickou inverzí.

Možným vysvětlením vnitrodruhové variability počtu chromozómů v karyotypech tohoto druhu by také mohl být výskyt B chromozómů, což se nicméně u *G. spelaeum* neprokázalo. B chromozómy jsou nadpočetné chromozómy, které jsou postradatelné a jejichž počet je variabilní v rámci populací nebo i jedince (Tsurusaki 2007). Takový případ je prokázán u *Phalangium opilio* Linnaeus, 1761 (Eupnoi: Phalangidae) s $2n = 24-26$ (Juberthei 1956), kde jsou rozdílné počty chromozómy důsledkem fluktuace B chromozómů uvnitř jedné populace (Tsurusaki 2007). Běžný se zdá být výskyt B chromozómů zejména u druhu *Psathyropus tenuipes* (Eupnoi: Sclerosomatidae), u kterého byla zaznamenána dokonce vysoká míra fluktuace počtu B chromozómů od 0 do 19 (Tsurusaki 1993; Watanabe *et al.* 2009). Přítomnost B chromozómů může být jedním z důvodů vnitrodruhové variability sekáčů, nicméně v této diplomové práci nebyl zaznamenán výskyt B chromozómů u žádného jedince *Histrocostoma dentipalpe*. Zaznamenané rozdíly v počtu chromozómů u tohoto druhu tudíž nejsou důsledkem přítomnosti nadpočetných chromozómů, ale odrážejí interchromozómové přestavby stávajících chromozómů. Z těchto údajů, které jsou k dispozici, se můžeme domnívat, že se jedná o jednu ze dvou možností, které by vysvětlovaly vnitrodruhovou variabilitu. První možností je štěpení metacentrických nebo submetacentrických chromozómů cytotypu 1, které vedlo k zvýšení počtu chromozómů na $2n = 16$. Druhá pravděpodobnější možnost je fúze subtelocentrických chromozómů cytotypu 2, která vedla k redukci počtu chromozómů na $2n = 14$ a výskytu výhradně dvouramenných chromozómů. Vyloučený není ani předpoklad, že se může jednat o kryptické druhy, které nejsou u podřádu Dyspnoi neobvyklé (Schönhofer & Martens 2010; Schönhofer *et al.* 2013).

U všech analyzovaných druhů čeledi Nemastomatidae byla u samců zjištěna přítomnost chiazmat během diplotene a diakineze, což potvrzuje chiazmatickou meiózu i u této čeledi stejně jako u všech ostatních sekáčů (Tsurusaki 2007). Alternativní achiazmatická meióza se v rámci pavoukovců vyvinula několikrát nezávisle na sobě a to pouze u štírů (Shanahan & Hayman 1990), některých akariformních roztočů (Keyl 1957), pavouků z čeledi Dysderidae a Segestridae (Benavente & Wettstein 1980; Rodríguez Gil *et al.* 2002) a štírků z čeledi Chthoniidae (Štáhlavský & Král 2004). V rámci chiazmatické meiózy pavoukovců je pravděpodobně původní nízká frekvence chiazmat (Dolejš *et al.*

2011). Tuto hypotézu podporuje také zjištěná nízká frekvence chiazmat (jedno chiazma na bivalent) u druhů s vyššími počty chromozómů, které jsou u žlázatek pravděpodobně původní. U druhů s vyšší frekvencí chiazmat byla identifikována vždy maximálně dvě chiazmata u bivalentu, avšak počet bivalentů s viditelnými chiazmaty je u jednotlivých druhů variabilní. Nejvíce bivalentů (5) se dvěma chiazmaty bylo pozorováno u *Centetostoma ventalloi*, u které se nachází výrazně zvětšený pár chromozómů. Diploidní počet *C. ventalloi* (18) je nižší oproti *C. juberthiei* (26), u které byl pozorován výskyt bivalentů pouze s jedním chiazmatem. Dá se tedy předpokládat, že k snížení diploidního počtu chromozómů u *C. ventalloi* došlo pomocí fúzí více chromozómů, a tím i k výskytu výrazně většího páru. Značný rozdíl se nachází i mezi jednotlivými cytotypy *Histicostoma dentipalpe*. U prvního cytotypu byly identifikovány dva bivalenty s dvěma chiazmaty, zatímco u druhého byly tyto bivalenty celkem čtyři. Zajímavá je i variabilita počtu chiazmat u *Paranemastoma quadripunctatum*. Některé diplotene u tohoto druhu obsahovaly pouze bivalenty s jedním chiazmatem, zatímco jiné diplotene obsahovaly až tři bivalenty s dvěma chiazmaty. Výskyt bivalentů s jedním až dvěma chiazmaty se zdá být u sekáčů běžným jevem (např. Svojanovská *et al.* 2016; Šťáhlavský *et al.* 2018), avšak zaznamenány byly i bivalenty s třemi chiazmaty (Svojanovská *et al.* 2016).

Jednou z dalších charakteristik karyotypu je přítomnost pohlavních chromozómů, která může být druhově specifická. U sekáčů se očekává, že je původní karyotyp bez přítomnosti morfologicky diferenciovaných pohlavních chromozómů (Tsurusaki 2007). Nicméně pohlavní systém XY byl zaznamenán u *Sabacon makinoi* (Dyspnoi: Sabaconidae) (Tsurusaki 1989). Nejedná se o jediný případ výskytu pohlavních chromozómů XY, tento pohlavní systém byl objeven i v čeledi Sclerosomatidae (Eupnoi) (Suzuki 1957; Parthasarathy & Goodnight, 1958; Tsurusaki & Holmberg 1986). Pohlavní systém XY se vyskytuje i u některých jiných řádů pavoukovců. Identifikován byl například u několika čeledí pavouků (Řezáč *et al.* 2006; Maddison & Leduc-Robert 2013) u roztočů čeledi Ixodoidea (Oliver 1977) a štírků čeledi Neobisidae (Troiano 1990, 1997). U sekáčů byl dokonce u druhu *Mitopus morio* Fabricius, 1799 (Eupnoi: Phalangiidae) nalezen pohlavní systém chromozómů ZW (Tsurusaki & Cokendolpher 1990). Jedná se o první záznam o tomto pohlavním systému napříč celou třídou pavoukovců (Tsurusaki 2007). V recentní době došlo k zpochybnění určení pohlavních chromozómů ve starších publikacích, s tím, že se může jednat o špatnou interpretaci a ve skutečnosti se nemusí jednat o pohlavní chromozómy. Nepřesná interpretace může být způsobena variabilitou rDNA klastrů

vyvolanou ektopickou rekombinací, nestejným crossing-overem nebo duplikací genů (Šťáhlavský *et al.* 2018). Ačkoliv jsou v podřádu Dyspnoi identifikované pohlavní chromozómy, tak u žádného z 12 studovaných druhů žlaznatek nebyly v buněčných fázích detekovány morfologicky diferenciované chromozómy, které by naznačovali přítomnost pohlavních chromozómů. Absence pohlavních chromozómů se považuje za ancestrální stav karyotypu u pavoukovců (Král *et al.* 2008).

5.2. Výskyt nukleolárních organizátorů jadérka

Fluorescenční *in situ* hybridizace je poměrně nově používána metoda pro zobrazení NORů. Oblasti NORů mohou napomoci k zachycení specifických chromozómových přestaveb v evoluci karyotypu (např. Nguyen *et al.* 2010; Grzywacz *et al.* 2011; Panzera *et al.* 2012). Dále mohou NORy pomoci odhalit odlišnosti v karyotypech a tím rozlišit skupiny se stejným diploidním počtem chromozómů. To se například podařilo u jiných skupin členovců například brouků z čeledi Scarabaeidae (Cabral de Mello *et al.* 2011) nebo štírů z čeledi Buthidae (Ojanguren-Affilastro *et al.* 2017). Nicméně údaje o počtu a pozici NORů u pavoukovců jsou především získané tzv. metodou stříbření. Tato metoda ovšem zachycuje NORy, které jsou aktivní pouze v předchozí interfázi a jejich reálný počet může být značně odlišný (Forman *et al.* 2013). Touto metodou byly doposud zjištěny údaje o počtu NORů pouze u tří druhů sekáčů. Jediný NOR byl zjištěn u *Psathyropus tenuipes* (Eupnoi: Sclerosomatidae) (Gorlov & Tsurusaki 2000) a u *Dyscocyrtus pectinifemur* (Laniatores: Gonyleptidae) (Schneider *et al.* 2008). Dále byl identifikován jeden pár NORů u druhu *Goniosoma spelaeum* (Laniatores: Gonyleptidae) (Oliveira *et al.* 2006). První rozsáhlejší studie u sekáčů, která použila již novější metodu FISH, se zaměřila na podřád Cyphophthalmi (Svojanovská *et al.* 2016). V rámci analýzy 6 druhů tohoto podřádu bylo u jednoho z nich zjištěno dokonce až 5 párů klastrů rDNA, přestože většina pavoukovců má jeden pár klastrů rDNA. Nicméně předpoklad jednoho páru klastru rDNA může být zkreslen právě hojně používanou metodou stříbření. Další údaje získané využitím metody FISH u sekáčů přichází z podřádu Eupnoi, konkrétně čeledi Phalangidae (Šťáhlavský *et al.* 2018). Výsledky odhalují vysokou variabilitu v počtu a velikosti klastrů 18S rDNA mezi jednotlivými druhy, přičemž nejvíce sedm klastrů 18S rDNA je u druhu *Rhampsinitus leighi* Pocock, 1903. Takové rozdíly jsou odůvodněny intenzivní změnou chromozómů a rychlou evoluční dynamikou 18S rDNA klastrů (Šťáhlavský *et al.* 2018). Do určité míry se podobné výsledky podařilo zjistit také v rámci širšího spektra analyzovaných druhů čeledi Nemastomatidae v rámci této diplomové práce.

Aplikací metody FISH s využitím nepřímě značené sondy pro 18S rDNA byly analyzovány všechny zkoumané druhy až na *Histricostoma argenteolunulatum*. U všech zkoumaných jedinců byla potvrzena přítomnost alespoň jednoho páru signálu nacházející se na jednom páru chromozómů, což odpovídá dosavadní hypotéze o původním počtu rDNA klastrů u pavoukovců (Forman *et al.* 2013). V rámci žlaznatek bylo nicméně detekováno u různých skupin zmnožení počtu těchto klastrů. Tři signály byly lokalizovány u *Nemastoma bidentatum martensi* a *N. dentigerum* u obou populací. Nejvíce čtyři signály byly lokalizovány u *Centetostoma juberthei*, *Mitostoma pyrenaeum*, *Nemastoma bidentatum sparsum* a *Paranemastoma quadripunctatum*. Pozice identifikovaných NORů na chromozómech jsou také variabilní. Pozorován byl výskyt signálu buď poblíž centromery, nebo v terminální pozici, která se považuje za ancestrální u pavoukovců (Forman *et al.* 2013). Signál klastru 18S rDNA, který se vyskytuje blíže k centromere, se objevuje hlavně u druhů, jejichž počet chromozómů je oproti předpokládanému ancestrálnímu stavu redukován (*Carinostoma carinatum* $2n = 12$; všechny druhy *Nemastoma* $2n = 14-16$). Změna polohy 18S rDNA tudíž patrně souvisí s předpokládanými fúzemi chromozómů během karyotypové evoluce žlaznatek. V případě *Nemastoma dentigerum* byla odhalena variabilita v pozici signálu 18S rDNA i mezi populacemi. U jedné populace *N. dentigerum* se nachází třetí signál 18S rDNA na odlišném chromozómu než je první pár signálu, zatímco u druhé populace je tento signál poblíž párového signálu. Nízká mobilita, typická pro sekáče (Giribet & Kury 2007), může vést k různým genetickým diferenciacím mezi populacemi v relativně malém geografickém rozsahu u mnoha pavoukovců (např. Kotrbová *et al.* 2016; Opatová *et al.* 2016). Tedy i u populací *N. dentigerum* mohlo dojít k odlišným akumulacím chromozómových přestaveb a tím i posunu klastrů 18S rDNA. Rozdíly v pozici 18S rDNA nicméně nebyly nalezeny u jednotlivých cytotypů *Histricostoma dentipalpe*. Oba cytotypy nesou jeden párový signál nacházející se na terminální části stejného chromozómu. Z této informace se dá předpokládat, že je tento chromozómový pár pro oba cytotypy identický a v případné chromozómové přestavbě vedoucí ke změně počtu chromozómů nehraje významnou roli.

Dalším zajímavým objevem této práce je variabilita počtu klastrů 18S rDNA mezi jednotlivými poddruhy *Nemastoma bidentatum* a to i přesto, že pomocí standardní cytogenetické analýzy se zdají být karyotypy všech čtyř studovaných poddruhů prakticky shodné. Zde se u všech poddruhů nachází alespoň jeden pár signálu 18S rDNA lokalizován

na nejdelším chromozómovém páru. Dále je pak třetí signál klastru 18S rDNA lokalizován u *N. b. martensi* a dokonce dva signály navíc má *N. b. sparsum*. Vysvětlení variability počtu klastrů 18S rDNA pomocí rozsáhlejších chromozómových přestaveb je vzhledem k stejnému diploidnímu počtu a morfologii chromozómů nepravděpodobné. Variabilita těchto poddruhů, které jsou si vzájemně částečně sympatrické, může být způsobena hybridizacemi jednotlivých poddruhů. Dalším vysvětlením může být obecný předpoklad o rozptýlení NORů pomocí ektopické rekombinace nebo transpozice (Carbero & Camacho 2008).

V diplomové práci se podařilo zjistit, že žlaznatky patří mezi čeled' se značnou variabilitou jak v počtu chromozómů ($2n = 12-30$), jejich velikosti i morfologii a také i v počtu a pozici klastrů 18S rDNA (viz přílohy Obr. 25). Tyto základní cytogenetické charakteristiky v kontextu známých fylogenetických vztahů mezi jednotlivými rody žlaznatek naznačují, že u žlaznatek došlo několikrát k nezávislé redukci v počtu chromozómů pomocí centrických či tandemových fúzí, které se akumulovali na jeden (či několik málo) chromozómový pár, což vedlo k jeho nápadnému zvětšení. Navíc jsou tyto úvahy podpořeny i výskytem klastrů 18S rDNA poblíž centromery u druhů s nižším diploidním počtem, zatímco terminální pozice klastrů 18S rDNA je pozorována u druhů s vyšším diploidním počtem. Takové rozdíly jsou odůvodněny intenzivní změnou chromozómů a rychlou evoluční dynamikou klastrů 18S rDNA (Šťáhlavský *et al.* 2018). Tyto procesy mohou být obecnou charakteristikou nejen žlaznatek, ale i celého řádu sekáčů.

6. Závěr

Dosavadní informace o karyotypu čeledi Nemastomatidae (Opiliones) pocházeli ze tří druhů, jmenovitě *Nemastoma lugubre* ($2n = 16$), *N. dentigerum* ($2n = 16$) a *Mitostoma chrysomelas* ($2n = 24$). Navíc se jednalo pouze o údaje o počtu chromozómů. Na základě analýzy 12 druhů ze 7 rodů této čeledi se však variabilita počtu chromozómů ukázala být vyšší ($2n = 12-30$). Zdá se, že u žlaznatek během karyotypové evoluce došlo k redukci počtu chromozómů z původních $2n = 30$ zejména vlivem fúzí chromozómů, což vedlo ke zřetelné velikostní diferenciaci chromozómů u druhů, které mají nižší diploidní počty. Žlaznatky patří mezi skupinu sekáčů s nízkou mobilitou, díky čemuž se můžou vyskytovat výrazné rozdíly v karyotypech na relativně malém geografickém areálu. Takový případ mohl nastat u zjištěných cytotypů *Histicostoma dentipalpe*. Pomocí metody FISH s nepřímou značenou sondou 18S rDNA byla odhalena variabilita v počtu i pozici NORů. Rozdíly v pozici i počtu NORů se vyskytují i v rámci jednoho druhu (*Nemastoma bidentatum*, *N. dentigerum*). Značné rozdíly v karyotypech analyzovaných žlaznatek pozorované za využití různých cytogenetických metod ukazují, že tyto metody můžou být vhodné pro taxonomické účely. Detailní znalost karyotypů tudíž může pomoci identifikovat kryptické druhy, které se u morfologicky uniformního podřádu Dyspnoi mohou vyskytovat. Ukázalo se, že karyotypová rozmanitost čeledi Nemastomatidae je poměrně značná a pro hlubší pochopení konkrétních mechanismů karyotypové evoluce bude třeba v budoucnu získat ještě detailnější znalosti o cytogenetické charakteristice jednotlivých druhů a zejména také přesnější představu o fylogenezi celé čeledi.

7. Literatura

Almeida B. R. R., Milhomem-Paixao S. S. R., Noronha R. C. R., Nagamachi C. Y., da Costa M. J. R., Pardal P. P. P., Coelho J. S., Pieczarka C. (2017): Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genetics*, 18(1): 35.

Araujo D., Oliveira, E. G., Giroti A. M., Mattos V. F., Paula-Neto E., Brescovit A. D., Schneider M. C., Cella D. M. (2015): Chromosome evolution in lycosoid spiders (Araneomorphae): a scenario based on analysis of seven species of the families Lycosidae, Senoculidae and Trechaleidae. *Journal of Arachnology*, 43: 174-181.

Araujo D., Schneider M. C., Paula-Neto E., Cella D. M. (2018): The spider cytogenetic database. Available in www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase (Dostupné 25. 4. 2018).

Benavente, R., Wettstein, R. (1980): Ultrastructural characterization of the sex chromosomes during spermatogenesis of spiders having holocentric chromosomes and long diffuse stage. *Chromosoma*, 77: 69-82.

Cabral de Mello D. C., Moura R. C., Martins C. (2011): Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. *Cytogenetic and Genome Research*, 134: 127-135.

Cabrero J., Camacho J. P. M. (2008): Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Research*, 16: 595-607.

Dolejš P., Kořínková T., Musilová J., Opatová V., Kubcová L. (2011): Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology*, 108: 1-16.

Dunlop J. A., Anderson L. I., Kerp H., Hass H. (2003): Preserved organs of Devonian harvestmen. *Nature*, 425: 916.

Fernández R., Sharma P. P., Tourinho A. L., Giribet G. (2017): The Opiliones tree of life: shedding light on harvestmen relationships through transcriptomics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1849: 284.

Forman M., Nguyen P., Hula V., Král J. (2013): Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenetics and Genome Research*, 141: 43-49.

Giribet G. (2000): Catalogue of the Cyphophthalmi of the World (Arachnida, Opiliones). *Revista Ibérica de Aracnologia*, 2: 49-76.

Giribet G. (2002): *Stylocellus ramblae*, a new stylocellid (Opiliones, Cyphophthalmi) from Singapore, with a discussion of the family Stylocellidae. *Journal of Arachnology*, 30: 1-9.

Giribet G., Kury A. B. (2007): Phylogeny and Biogeography. **In:** Pinto-da-Rocha R, Machado G, Giribet G (Eds) Harvestmen: The Biology of Opiliones. *Harvard University Press, Cambridge, MA, USA*, 62-87.

Gonzalo G., Prashant P. S. (2015): Evolutionary Biology of Harvestmen (Arachnida, Opiliones), *Annual Review of Entomology*, 60: 157-175.

Giribet G., Vogt L., Perez Gonzalez A., Sharma P., Kury A. B. (2010): A multilocus approach to harvestman (Arachnida: Opiliones) phylogeny with emphasis on biogeography and the systematics of Laniatores. *Cladistics*, 26: 408-437.

Giribet G., Sharma P. P., Benavides L. R., Boyer S. L., Clouse R. M., Bivort B. L. D. E., Dimitrov D., Kawauchi G. Y., Murienne J., Schwendinger P. J. (2012): Evolutionary and biogeographical history of an ancient and global group of arachnids (Arachnida: Opiliones: Cyphophthalmi) with a new taxonomic arrangement. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105: 92-130.

Gorlov I. P., Tsurusaki N. (2000): Staggered clines in a hybrid zone between two chromosome races of the harvestman *Gagrellopsis nodulifera* (Arachnida: Opiliones). *Evolution*, 7: 157-168.

Groh S., Giribet G. (2015): Polyphyly of Caddoidea, reinstatement of the family Acropsopilionidae in Dyspnoi, and a revised classification system of Palpatores (Arachnida, Opiliones). *Cladistics*, 31: 277-290.

Gruber J. (2007): Dyspnoi - Historical systematic synopsis and family chapters. In: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet., G. (Eds), Harvestmen: The Biology of Opiliones. *Harvard University Press, Cambridge*, 148-151.

Gruber J., Martens J. (1968): Morphologie, Systematik und Ökologie der Gattung *Nemastoma* C.L. Koch (s.str.) (Opiliones, Nemastomatidae). *Senckenbergiana Biologica.*, 49: 137-172.

Grzywacz B., Maryanska-Nadachowska A., Chobanov D. P., Karamysheva T., Warchalowska-Sliwa E. (2011): Comparative analysis of the location of rDNA in the Palaearctic bushcricket genus *Isophya* (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). *European Journal of Entomology*, 108: 509-517.

Hansen H. J., Sörensen W. (1904): On Two Orders of Arachnida: Opiliones, Especially the Suborder Cyphophthalmi, and Ricinulei, Namely the Family Cryptostemmatoidae. *Cambridge University Press, Cambridge*.

Hedin M., Starrett J., Akhter S., Schönhöfer A. L., Shultz J. W. (2012): Phylogenomic resolution of Paleozoic divergences in harvestmen (Arachnida, Opiliones) via analysis of nextgeneration transcriptome data. *PLoS ONE* 7, e428888.

Juberthie C. (1956): Nombres chromosomiques chez les Sironidae, Trogulidae, Ischyropsalidae, Phalangiidae (Opiliones). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris*, 242: 2860-2862.

Keyl, H. G. (1957): Zur Karyologie der Hydrachnellen (Acarina). *Chromosoma*, 8: 719-729.

Kotrbová J., Opatova V., Gardini G., Šťáhlavský F. (2016): Karyotype diversity of pseudoscorpions of the genus *Chthonius* (Pseudoscorpiones, Chthoniidae) in the Alps. *Comparative Cytogenetics*, 10: 325-345.

Král J., Kováč L., Šťáhlavský F., Lonský P., Luptáček P. (2008): The first karyotype study in palpigrades, a primitive order of arachnids (Arachnida: Palpigradi). *Genetica*, 134: 79-87.

Král J., Kořínková T., Forman M., Krkavcová L. (2011): Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. *Cytogenetics and Genome Research*, 133: 43-66.

Král J., Kořínková T., Krkavcová L., Musilová J., Forman M. (2013): Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 109: 377-408.

Kratochvíl J. (1958): Höhlenweberknechte Bulgariens (Palpatores— Nemastomatidae). *Práce Brněnské základny Československé akademie věd, Brno*, 30(12): 523-576.

Kury A.B. (2018): Classification of Opiliones. Museu Nacional/UFRJ website. Online at: <http://www.museunacional.ufrj.br/mndi/Aracnologia/opiliones.html> (Dostupné 25. 4. 2018).

Maddison W. P., Leduc-Robert G. (2013): Multiple origins of sex chromosome fusions correlated with chiasma localization in Habronattus jumping spiders (Araneae: Salticidae). *Evolution*, 67 6-8: 2258-2272.

Martens J. (1980): Versuch eines phylogenetischen Systems der Opiliones. Proceedings of the 8th International Congress of Arachnology (J. Gruber, ed.) *Verlag H. Egermann, Vienna.*, 355-360.

Martens J. (1986): Die Großgliederung der Opiliones und die Evolution der Ordnung (Arachnida) Proceedings of the 10th International Congress of Arachnology (J.A. Barrentos, ed.) *Instituto Pirenaico de Ecología & Grupo de Aracnología, Barcelona, Spain.*, 289-310.

Martens J. (2016): *Sinostoma yunnanicum*, the first nemastomatine harvestman in China (Arachnida: Opiliones: Nemastomatidae). *Zootaxa*, 4126(3): 444-450.

Martens J. (2017): On *Starengovia* Snegovaya, a genus of Asian nemastomatines (Arachnida: Opiliones: Nemastomatidae). *Revue Suisse de Zoologie*, 124: 187-201.

- Mattos V. F., Cella D. M., Carvalho L. S., Candido D. M., Schneider M. C. (2013):** High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. *Chromosome Research*, 21: 121-136.
- Mattos V. F., Carvalho L. S., Cella D. M., Schneider M. C. (2014):** Location of 45S ribosomal genes in mitotic and meiotic chromosomes of buthid scorpions. *Zoological Science*, 31: 603-607.
- Miller D. A., Dew V., Tantravahi R., Miller O. (1976):** Suppression of human nucleolar organizer activity in mouse human somatic hybrid cells. *Experimental Cell Research*, 101: 235-243.
- Nguyen P., Sahara K., Yoshido A., Marec F. (2010):** Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, 138: 343-354.
- Ojanguren-Affilastro A. A., Adilardi R. S., Cajade R., Ramírez M. J., Ceccarelli F. S., Mola L. M. (2017):** Multiple approaches to understanding the taxonomic status of an enigmatic new scorpion species of the genus *Tityus* (Buthidae) from the biogeographic island of Paraje Tres Cerros (Argentina). *PLoS ONE*, 12(7): e0181337.
- Oliveira R. M., Zacaro A. A., Gnaspini P., Cella D. M. (2006):** Cytogenetics of three Brazilian *Goniosoma* species: A new record for diploid number in Laniatores (Opiliones, Gonyleptidae, Goniosomatinae). *Journal of Arachnology*, 34: 435-443.
- Oliver J. H. (1977):** Cytogenetics of mites and ticks. *Annual Reviews of Entomology*, 22: 407-429.
- Opatova V., Bond J. E., Arnedo M. A. (2016):** Uncovering the role of the Western Mediterranean tectonics in shaping the diversity and distribution of the trap-door spider genus *Ummidia* (Araneae, Ctenizidae). *Journal of Biogeography*, 43: 1955-1966.
- Parthasarathy M. D., Goodnight C. J. (1958):** The chromosomal patterns of some Opiliones (Arachnida). *Transactions of the American Microscopical Society*, 77: 353-364.
- Panzer Y., Pita S., Ferreiro M. J., Ferrandis I., Lages C., Pérez R., Silva A. E., Guerra M., Panzer F. (2012):** High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug

holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenetic and Genome Research*, 138: 56-67.

Paula-Neto E., Araujo D., Carvalho L. S., Cella D. M., Schneider M. C. (2013): Chromosomal characteristics of a Brazilian whip spider (Amblypygi) and evolutionary relationships with other arachnid orders. *Genetics and Molecular Research*, 12: 3726-3734.

Pinto-da-Rocha R., Machado G., Giribet G. (2007): (eds): Harvestmen: The Biology of Opiliones *Harvard University Press, Cambridge*

Pinto-da-Rocha R., Bragagnolo C., Marques F. P. L., Antunes Junior M. (2014): Phylogeny of harvestmen family Gonyleptidae inferred from a multilocus approach (Arachnida: Opiliones). *Cladistics*, 30: 519-39.

Rodríguez Gil S. G., Mola L. M., Papeschi A. G. (2002): Cytogenetic heterogeneity in common haplogyne spiders from Argentina (Arachnida, Araneae). *Journal of Arachnology*, 30: 47-56.

Roewer C. F. (1951): Über Nemastomatiden. Weitere Weberknechte XVI. *Senckenbergiana*, 32(1/4): 95-153.

Řezáč M., Král J., Musilová J., Pekár S. (2006): Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). *Hereditas*, 143: 123-129.

Sakamoto Y., Zacaro A. A. (2009): LEVAN, an ImageJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes, Initial version. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Sahara K., Marec F., Traut W. (1999): TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research*, 7: 449-460.

Shanahan C. M., Hayman D. L. (1990): Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmatic meiosis and structural heterozygosity. *Genome*, 33: 914-927.

- Sharma P. P., Giribet G. (2011):** The evolutionary and biogeographic history of the armoured harvestmen Laniatores phylogeny based on ten molecular markers, with the description of two new families of Opiliones (Arachnida). *Invertebrate Systematics*, 25: 106-142.
- Shear W. A. (2006):** *Martensolasma jocheni*, a new genus and species of harvestman from México (Opiliones, Nemastomatidae, Ortholasmatinae). *Zootaxa*, 1325: 191-198.
- Shear W. A. (2010):** New species and records of ortholasmatine harvestmen from México, Honduras, and the western United States (Opiliones, Nemastomatidae, Ortholasmatinae). *ZooKeys*, 52: 9-45.
- Shear W., Gruber J. (1983):** The Opilionid Subfamily Ortholasmatinae (Opiliones, Troguloidea, Nemastomatidae). *American Museum Novitates*, 2757: 1-68.
- Shultz J. W. (1998):** Phylogeny of Opiliones (Arachnida): an assessment of the „Cyphopalpatores“ concept. *Journal of Arachnology*, 26: 257-272.
- Schneider M. C., Zacaro A. A., Oliveira R. M., Gnaspini P., Cella D. M. (2008):** Conventional and ultrastructural analyses of the chromosomes of *Discocyrtus pectinifemur* (Opiliones, Laniatores, Gonyleptidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47: 203-207.
- Schneider M. C., Zacaro A. A., Pinto-da-Rocha R., Candido D. M., Cella D. M. (2009):** A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of scorpiones. *The Journal of Heredity*, 100: 545-555.
- Schneider M. C., Mattos V. F., Cella D. M. (2018):** The Scorpion Cytogenetic Database, Available in www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase
- Schönhofer A. L. (2013):** A taxonomic catalogue of the Dyspnoi Hansen and Sørensen, 1904 (Arachnida: Opiliones). *Zootaxa*, 3679.
- Schönhofer A. L., Martens J. (2010):** Hidden Mediterranean diversity: Assessing species taxa by molecular phylogeny within the opilionid family Trogulidae (Arachnida, Opiliones). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1): 59-75.

Schönhofer A. L., Martens, J. (2012): The enigmatic alpine opilionid *Saccarella schilleri* gen. n., sp. n. (Arachnida: Nemastomatidae) isolated systematic placement inferred from comparative genital morphology. *Organisms Diversity and Evolution*, 12(4): 409-419.

Schönhofer A. L., Karaman I. M., Martens J. (2013): Revision of the genus *Trogulus* Latreille: The morphologically divergent *Trogulus torosus* species-group of the Balkan Peninsula (Opiliones: Dyspnoi: Trogulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 167: 360-388.

Schwendinger P. J., Gruber J. (1992): A new *Dendrolasma* (Opiliones, Nemastomatidae) from Thailand. *Bulletin of the British Arachnological Society*, 9: 57-60.

Simon E. (1872): Notice sur les Arachnides cavernicoles et hypogés. *Annales de la Société Entomologique de France, Paris (Série 5)*, 2(5): 215-244.

Sokolow I. (1929): Untersuchungen über die Spermatogenese bei den Arachniden. III. Über die Spermatogenese der *Nemastoma lugubre* (Opiliones). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 8: 617-654.

Svojanovská H., Nguyen P., Hiřman M., Tuf I. H., Wahab R. A., Haddad C. R., Šťáhlavský F. (2016): Karyotype evolution in harvestmen of the suborder Cyphophthlami (Opiliones). *Cytogenetic and Genome Research*, 148: 227-236.

Suzuki S. (1957): On the three closely related forms of the genus *Leiobunum* (Phalangidae, Opiliones). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, VI, Zoology*, 13: 109-117.

Šilhavý V. (1966): Über die Genitalmorphologie der Nemastomatidae (Arach., Opiliones). *Senckenbergiana Biologica*, 47: 67-72.

Šťáhlavský F. (2018): The pseudoscorpion cytogenetic database. Available in www.arthropodacytogenetics.bio.br/pseudoscorpiondatabase (Dostupné 25. 4. 2018).

Šťáhlavský F., Král J. (2004): Karyotype analysis and achiasmatic meiosis in pseudoscorpions of the family Chthoniidae (Arachnida: Pseudo- scorpiones). *Hereditas* 140: 49-60.

Šťáhlavský F., Boyer S. L., Harvey M. S., Giribet G. (2012): First cytogenetic study of a member of the harvestman family Pettalidae (Opiliones: Cyphophthalmi). *Australian Journal of Entomology*, 51(4): 299-302.

Šťáhlavský F., Opatova V., Just P., Lotz L. N., Haddad C. R. (2018): Molecular technique reveals high variability of 18S rDNA distribution in harvestmen (Opiliones, Phalangiidae) from South Africa. *Comparative Cytogenetics*, 12(1), 41-59.

Traut W. (1976): Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombix mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma*, 58: 275-284.

Troiano G. (1990): Karyotype and male meiosis of four species of *Roncus* L. Koch, 1873 (Pseudoscorpionida, Neobisiidae). *Bolletino di Zoologia*, 57: 1-9.

Troiano G. (1997): Further studies on karyology of the pseudoscorpions of the gen. *Roncus*: the karyotype of *Roncus gestroi* and *Roncus belluatii*. *Caryologia*, 50: 271-279.

Tsurusaki N. (1985): Geographic variation of chromosomes and external morphology in the montanum-subgroup of the *Leiobunum curvipalpe*-group (Arachnida, Opiliones, Phalangiidae) with special reference to its presumable process of racion. *Zoological Science*, 2: 767-783,

Tsurusaki N. (1989): Geographic variation of chromosomes in *Sabacon makinoi* Suzuki (Arachnida, Opiliones, Sabaconidae). *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan*, 44: 111-116.

Tsurusaki N. (1993): Geographic variation of the number of B chromosomes in *Metagagrella tenuipes* (Opiliones, Phalangiidae, Gagrellinae). *Memoirs of the Queensland Museum*, 33: 659-665.

Tsurusaki N. (2007): Harvestmen: The Biology of Opiliones. *Cytogenetics*, 6: 266-279.

Tsurusaki N., Holmberg R. G (1986): Chromosomes of *Leiobunum japonicum japonicum* and *Leiobunum paessleri* (Arachnida, Opiliones). *Journal of Arachnology*, 14: 123-125.

Tsurusaki N., Cokendolpher J. C. (1990): Chromosomes of sixteen species of harvestmen (Arachnida, Opiliones, Caddidae and Phalangididae). *Journal of Arachnology*, 18: 151-166.

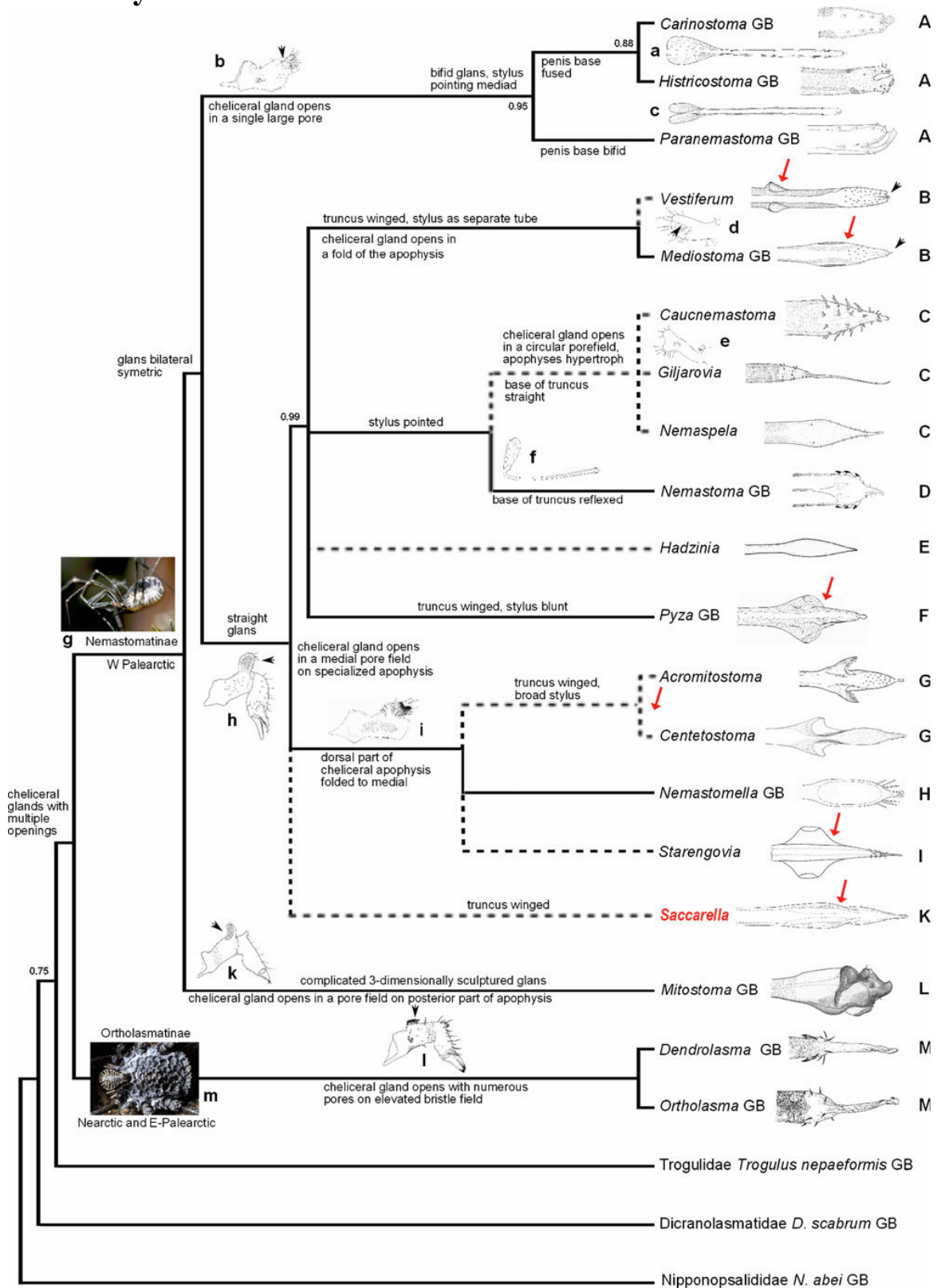
Tsurusaki N., Svojanovská H., Schönhofer A. L., Šťáhlavský F. (2018): The harvestmen cytogenetic database. Available in <http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/index.html> (Dostupné 25. 4. 2018).

Wachmann E. (1970): Der Feinbau der sog. Kugelhaare der Fadenkanker (Opiliones, Nemastomatidae). *Zeitschrift für Zellforschung*, 103: 518-525.

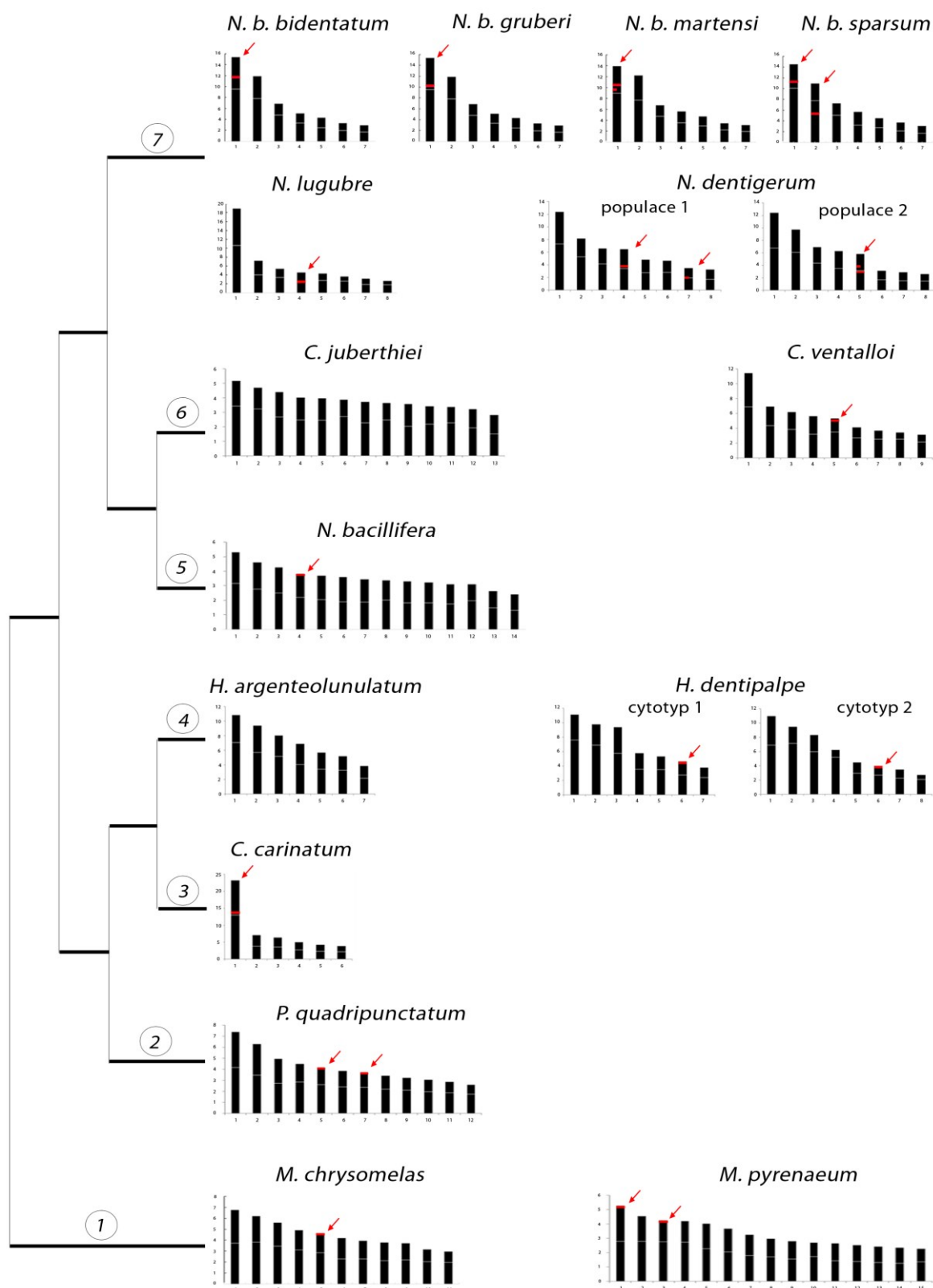
Watanabe M., Tsurusaki N., Kubota S. (2009): Molecular cytogenetic characterization of 5S ribosomal DNA in the harvestman *Psathyropus tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Chromosome Science*, 12: 51-53.

Zhang C., Zhang F. (2013): Description of a new *Cladolasma* (Opiliones: Nemastomatidae: Ortholasmatinae) species from China. *Zootaxa*, 3691(4): 443-452.

8. Přílohy



Obrázek 24: Systematický rámec Troguloidea zobrazující rozdíly v morfologii penisu. Převzato z Schönhofer & Martens (2012).



Obrázek 25: Ideogramy analyzovaných žlaznatek a zobrazení předpokládaných fylogenetických vztahů jednotlivých rodů. 1 – *Mitostoma*; 2 – *Paranemastoma*; 3 – *Carinostoma*; 4 – *Histicostoma*; 5 – *Nemastomella*; 6 – *Centetostoma*; 7 – *Nemastoma*; červené šipky ukazují chromozómy se signálem klastru 18S rDNA. Fylogenetický strom převzat a upraven z Schönhofer (2013).

Tabulka 2: Shrnutí vyhotovených a použitých vzorků v analýze; Sex - M - samec, F - samice; 2n – diploidní počet; 18S – čísla udávají počet signálu klastru 18S v diploidním počtu

Druh	Kód	Sex	2n	18S	Stát	Lokalita	GPS
Carinostoma							
Carinostoma carinatum							
<i>C. carinatum</i>	AlpenO 22	M	12	2	Itálie	Lago di Verzegnis	46.3805, 12.9646
<i>C. carinatum</i>	AlpenO 23	M	12		Itálie	Lago di Verzegnis	46.3805, 12.9646
<i>C. carinatum</i>	AlpenO 24	M	12		Itálie	Lago di Verzegnis	46.3805, 12.9646
<i>C. carinatum</i>	AlpenO 53	M	12	2	Slovinsko	Volča jama na Nanosu	45.8199, 14.0681
Centetostoma							
Centetostoma juberthei							
<i>C. juberthei</i>	FR 41	M	26		Španělsko	Molló	42.3691, 2.4317
<i>C. juberthei</i>	FR 42	M	26		Francie	Prats-de-Mollo-la-Preste	42.3736, 2.4547
<i>C. juberthei</i>	FR 44	M	26	4	Francie	Prats-de-Mollo-la-Preste	42.3736, 2.4547
<i>C. juberthei</i>	FR 45	M	26	4	Francie	Prats-de-Mollo-la-Preste	42.3736, 2.4547
<i>C. juberthei</i>	FR 46	M	26		Francie	Prats-de-Mollo-la-Preste	42.3736, 2.4547
<i>C. juberthei</i>	SP 292	M	26		Andora	Canillo	42.5724, 1.6154
Centetostoma ventalloi							
<i>C. ventalloi</i>	FR 19	M	18		Španělsko	Naut Aran	42.6639, 0.9805
<i>C. ventalloi</i>	FR 20	M	18		Španělsko	Naut Aran	42.6639, 0.9805
<i>C. ventalloi</i>	FR 24	M	18	2	Francie	Nistos - mountains	42.9712, 0.4664
<i>C. ventalloi</i>	FR 25	M	18		Francie	Nistos - mountains	42.9712, 0.4664
Histricostoma							
Histricostoma argenteolunulatum							
<i>H. argenteolunulatum</i>	Opilio 475	M	14		Itálie	Torino, Cascina Bert	45.0438, 7.7033
Histricostoma dentipalpe							
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 2	AlpenJ 125	M	16	2	Slovinsko	Kamniška Bistrica	46.2957, 14.6140
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 1	FR 29	M	14		Francie	Col de Turini	43.9757, 7.3862
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 1	FR 32	M	14		Francie	Col de Turini	43.9757, 7.3862
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 1	FR 33	M	14		Francie	Col de Turini	43.9757, 7.3862
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 2	Opilio 63	F	16		Itálie	Brenta	46.0107, 11.2723
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 2	Opilio 87	F	16		Itálie	Mazzo (near Vione)	46.2663, 10.2613
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 2	Opilio 247	M	16		Itálie	Egna	46.3145, 11.2880
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 2	Opilio 248	M	16	2	Švýcarsko	Randa	46.0848, 7.7819
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 2	Opilio 361	M	16		Itálie	Zambla	45.8804, 9.7779
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 2	Opilio 463	M	16		Itálie	Trento, SW Pregasina	45.8355, 10.7913
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 2	Opilio 479	M	16		Itálie	Trento, SW Pregasina	45.8355, 10.7913
<i>H. dentipalpe</i> cytotyp 1	Opilio 494	M	14	2	Itálie	Monesi di Triora	44.0707, 7.7484
Mitostoma							
Mitostoma chrysomelas							
<i>M. chrysomelas</i>	Opilio 182	M	22		Rakousko	Vienna - forrest	48.2665, 16.2962
<i>M. chrysomelas</i>	Opilio 183	F	22		Rakousko	Vienna - forrest	48.2665, 16.2962
<i>M. chrysomelas</i>	Opilio 184	M	22	2	Rakousko	Vienna - forrest	48.2665, 16.2962
<i>M. chrysomelas</i>	Opilio 234	M	22		Švýcarsko	Mauracker	46.2792, 7.81319
<i>M. chrysomelas</i>	Opilio 249	M	22		Švýcarsko	Randa	46.0848, 7.78199
<i>M. chrysomelas</i>	Opilio 454	M	22		Itálie	Passo Campogrosso	45.7265, 11.1739
Mitostoma pyrenaicum							
<i>M. pyrenaicum</i>	FR 61	M	30	4	Francie	Coume de Bourguy	42.9867, 0.4735
Nemastoma							
Nemastoma bidentatum							
<i>N. b. bidentatum</i>	AlpenJ 61	M	14		Slovinsko	Trzin	46.1283, 14.5520
<i>N. b. bidentatum</i>	AlpenO 45	M	14		Slovinsko	Črna jama	45.7996, 14.2073
<i>N. b. bidentatum</i>	AlpenO 57	M	14		Slovinsko	Črna jama	45.7996, 14.2073
<i>N. b. bidentatum</i>	AlpenO 58	M	14	2	Slovinsko	Črna jama	45.7996, 14.2073
<i>N. b. gruberi</i>	AlpenO 11	M	14		Slovinsko	Dolejne Lakvice	45.6737, 13.9777
<i>N. b. gruberi</i>	AlpenO 12	M	14	2	Slovinsko	Dolejne Lakvice	45.6737, 13.9777
<i>N. b. gruberi</i>	AlpenO 9	M	14		Slovinsko	Dolejne Lakvice	45.6737, 13.9777

<i>N. b. martensi</i>	AlpenO 18	M	14	3	Slovinsko	Poljane pri Podrgadu	45.4986, 14.0994
<i>N. b. martensi</i>	AlpenO 19	M	14		Slovinsko	Poljane pri Podrgadu	45.4986, 14.0994
<i>N. b. martensi</i>	AlpenO 20	M	14		Slovinsko	Poljane pri Podrgadu	45.4986, 14.0994
<i>N. b. martensi</i>	AlpenO 21	M	14		Slovinsko	Poljane pri Podrgadu	45.4986, 14.0994
<i>N. b. sparsum</i>	AlpenO 14	M	14		Slovinsko	Muravské Šuma	46.5630, 15.5776
<i>N. b. sparsum</i>	AlpenO 15	M	14		Slovinsko	Muravské Šuma	46.5630, 15.5776
<i>N. b. sparsum</i>	Nemastoma 13	M	14	4	Česká rep.	Praha, Horní Počernice	50.1198, 14.6303
<i>N. b. sparsum</i>	Nemastoma 23	M	14		Česká rep.	Vidov	48.9420, 14.5004
<i>N. b. sparsum</i>	Nemastoma 8	M	14		Česká rep.	Praha, Horní Počernice	50.1198, 14.6303
Nemastoma dentigerum							
<i>N. dentigerum</i>	Opilio 370	M	16	3	Itálie	Puria	46.0330, 9.0493
<i>N. dentigerum</i>	Opilio 371	M	16		Itálie	Puria	46.0330, 9.0493
<i>N. dentigerum</i>	Opilio 372	F	16		Itálie	Puria	46.0330, 9.0493
<i>N. dentigerum</i>	Opilio 379	M	16	3	Itálie	Loreglia	45.9022, 8.3708
<i>N. dentigerum</i>	Opilio 380	M	16		Itálie	Loreglia	45.9022, 8.3708
Nemastoma lugubre							
<i>N. lugubre</i>	Nemastoma 28	M	16		Česká rep.	PR V Kluči	49.3135, 15.5235
<i>N. lugubre</i>	Nemastoma 36	M	16		Česká rep.	Praha, Modřanská rokle	50.0021, 14.4581
<i>N. lugubre</i>	Nemastoma 40	M	16		Česká rep.	Praha, Modřanská rokle	50.0021, 14.4581
<i>N. lugubre</i>	Nemastoma 41	M	16		Česká rep.	Praha, Modřanská rokle	50.0021, 14.4581
<i>N. lugubre</i>	Nemastoma 49	M	16		Česká rep.	Ruda (Veselí n. Lužnicí)	49.1505, 14.6930
<i>N. lugubre</i>	Nemastoma 51	M	16	2	Česká rep.	Orlík	49.5118, 14.1506
<i>N. lugubre</i>	Opilio 252	M	16		Švýcarsko	Basel	47.5458, 7.6461
<i>N. lugubre</i>	Opilio 257	F	16		Švýcarsko	Faug	46.9022, 7.0699
Nemastomella							
Nemastomella bacillifera							
<i>N. bacillifera</i>	FR 22	M	28	2	Francie	Coume de Bourguy	42.9867, 0.4735
<i>N. bacillifera</i>	FR 26	M	28		Francie	Nistos	43.0171, 0.4800
<i>N. bacillifera</i>	FR 27	M	28		Francie	Nistos	43.0171, 0.4800
<i>N. bacillifera</i>	FR 62	F	28		Francie	Coume de Bourguy	42.9867, 0.4735
<i>N. bacillifera</i>	FR 63	F	28		Francie	Coume de Bourguy	42.9867, 0.4735
Paranemastoma							
Paranemastoma quadripunctatum							
<i>P. quadripunctatum</i>	Nemastoma 53	M	24		Česká rep.	Ruda (Veselí n. Lužnicí)	49.1505, 14.6930
<i>P. quadripunctatum</i>	Nemastoma 56	M	24		Česká rep.	Orlické hory, Orličky	50.0400, 16.6830
<i>P. quadripunctatum</i>	Opilio 254	M	24		Německo	Lanzenbach	47.5101, 10.0594
<i>P. quadripunctatum</i>	Opilio 296	F	24		Česká rep.	Boubínský prales	48.9800, 13.8109
<i>P. quadripunctatum</i>	Opilio 439	M	24		Itálie	Asagio	45.9094, 11.4572
<i>P. quadripunctatum</i>	Opilio 441	M	24	4	Itálie	Asagio	45.9094, 11.4572
<i>P. quadripunctatum</i>	Opilio 442	M	24		Itálie	Asagio	45.9094, 11.4572

Tabulka 3: Výsledky měření jednotlivých druhů žlaznatek. Relativní délka chromozómů haploidní sady v % (RL), poměr ramének (AR). Horní řada - čísla udávají jednotlivé páry chromozómů.

Druh		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
<i>Mitostoma pyrenaeum</i>	RL	5,29	4,55	4,42	4,12	3,94	3,67	3,25	2,97	2,81	2,72	2,66	2,53	2,42	2,36	2,28
	AR	1,10	1,58	2,03	1,84	1,32	1,30	1,26	1,33	1,26	1,83	1,16	1,24	1,16	1,11	1,47
<i>Nemastomella bacillifera</i>	RL	5,31	4,62	4,26	3,83	3,69	3,62	3,47	3,38	3,31	3,24	3,12	3,11	2,64	2,42	
	AR	1,47	1,52	1,41	1,45	1,24	1,12	1,20	1,52	1,26	1,32	1,27	1,79	1,27	1,19	
<i>Centetostoma juberthiei</i>	RL	5,19	4,70	4,40	4,04	3,98	3,88	3,74	3,65	3,57	3,43	3,39	3,23	2,83		
	AR	2,04	2,29	1,64	1,63	1,64	2,44	1,59	2,11	1,32	1,78	2,17	1,56	1,15		
<i>Paranemastoma quadripunctatum</i>	RL	7,38	6,31	4,95	4,49	4,15	3,86	3,72	3,43	3,23	3,06	2,85	2,58			
	AR	1,32	1,23	1,27	1,82	1,71	1,72	1,90	1,88	1,88	1,88	2,04	2,22			
<i>Mitostoma chrysomelas</i>	RL	6,79	6,20	5,61	4,91	4,64	4,20	3,96	3,81	3,73	3,18	2,97				
	AR	1,23	1,73	1,63	1,96	1,73	1,22	1,40	1,33	1,52	1,93	2,05				
<i>Centetostoma ventalloi</i>	RL	11,56	6,36	6,24	5,65	5,35	4,16	3,73	3,46	3,20						
	AR	1,56	1,62	1,86	1,35	2,30	1,89	2,59	2,96	2,35						
<i>Histricostoma dentipalpe</i> cytotyp 2	RL	11,01	9,50	8,38	6,27	4,53	4,01	3,52	2,79							
	AR	1,82	3,94	2,83	6,33	2,40	2,35	2,02	3,37							
<i>Nemastoma dentigerum</i> populace 1	RL	12,38	8,2	6,59	6,51	4,84	4,68	3,54	3,27							
	AR	1,45	1,79	1,71	1,1	1,30	1,51	1,22	1,10							
<i>Nemastoma dentigerum</i> populace 2	RL	12,46	9,75	6,97	6,31	5,82	3,13	2,93	2,65							
	AR	1,2	1,76	1,72	1,32	1,17	1,20	1,13	1,24							

Tabulka 3 pokračování

Druh		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
<i>Nemastoma lugubre</i>	RL	18,93	7,27	5,42	4,59	4,31	3,67	3,17	2,66							
	AR	1,30	1,26	2,33	1,29	1,85	2,46	1,51	2,4							
<i>Histricostoma argenteolunulatum</i>	RL	10,84	9,40	8,06	6,90	5,73	5,21	3,87								
	AR	2,54	1,57	1,76	1,45	1,51	1,80	1,25								
<i>Histricostoma dentipalpe</i> cytotyp 1	RL	11,16	9,79	9,42	5,83	5,35	4,65	3,80								
	AR	2,24	2,71	1,59	1,58	2,08	1,43	1,79								
<i>Nemastoma bidentatum bidentatum</i>	RL	15,44	11,94	6,88	5,11	4,35	3,37	2,92								
	AR	1,73	1,96	2,52	1,96	1,30	1,41	1,54								
<i>Nemastoma bidentatum gruberi</i>	RL	15,09	10,68	7,40	5,85	4,62	3,46	2,93								
	AR	1,50	2,63	2,50	1,12	1,64	2,38	1,66								
<i>Nemastoma bidentatum martensi</i>	RL	13,97	12,26	6,80	5,65	4,72	3,5	3,12								
	AR	1,81	1,78	2,51	1,91	1,87	1,78	1,81								
<i>Nemastoma bidentatum sparsum</i>	RL	14,55	11,02	7,31	5,73	4,56	3,75	3,10								
	AR	2,63	2,54	2,26	1,48	1,60	1,35	1,24								
<i>Carinostoma carinatum</i>	RL	23,20	7,16	6,39	5,05	4,33	3,87									
	AR	1,32	1,15	1,31	1,23	1,19	1,35									